

## Інструкція з використання

ВИКОРИСТОВУВАТИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO  
ЛИШЕ ДЛЯ ЕКСПОРТУ

## Передбачене використання

Секвенатор NovaSeq 6000Dx призначений для секвенування бібліотек ДНК під час діагностичних аналізів *in vitro* (IVD). Секвенатор NovaSeq 6000Dx призначений для використання з певними зареєстрованими, сертифікованими або схваленими реагентами для діагностики *in vitro* й аналітичним програмним забезпеченням.

## Принципи виконання процедури

Секвенатор Illumina® Секвенатор NovaSeq 6000Dx призначений для секвенування бібліотек ДНК за допомогою аналізів для діагностики *in vitro*. Для введення в секвенатор NovaSeq 6000Dx використовуються бібліотеки, отримані з ДНК, де індекси зразків і послідовності для захоплення додаються до ампліфікованих цільових фрагментів. Бібліотеки зразків фіксуються на проточній кюветі та секвенуються на секвенаторі за допомогою хімічної реакції секвенування шляхом синтезу (SBS). У хімічній реакції SBS використовується метод оборотних термінаторів для виявлення флуоресцентно мічених одонуклеотидних основ, тому що їх включено в нитки ДНК, які зростають. Програмне забезпечення Real-Time Analysis (RTA) виконує аналіз зображень і розпізнавання основ, а потім присвоює оцінку якості кожній основі в кожному циклі секвенування. Після завершення первинного аналізу можна запустити вторинний аналіз для обробки визначень основ на включеному в комплект і обов'язковому сервері Illumina DRAGEN для NovaSeq 6000Dx. У секвенаторі NovaSeq 6000Dx використовуються різні застосунки вторинного аналізу залежно від робочого процесу. Для застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx обробка включає демультіплексування, генерацію файлів FASTQ, вирівнювання, визначення варіантів і генерування файлів розпізнавання варіантів у форматі VCF і gVCF. Файли VCF і gVCF містять інформацію або про гермінальні, або про соматичні варіанти (залежно від вибраного робочого процесу), виявлені в конкретних позиціях еталонного геному.

## Подвійний режим роботи

Секвенатор NovaSeq 6000Dx має один завантажувальний жорсткий диск із окремими режимами: для діагностики *in vitro* (IVD) та використання тільки для досліджень (RUO). Режим можна вибрати за допомогою перемикача на екрані Sequencing (Секвенування). Вибраний режим чітко позначено на всіх екранах інтерфейсу. Секвенування для IVD, зокрема використання застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx в робочих процесах для зародкової лінії або соматичних варіантів, виконується в

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

режимі IVD. У режимі IVD можна використовувати лише реанти для секвенування IVD. Характеристики ефективності та обмеження процедури для NovaSeq 6000Dx було встановлено з використанням застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx у режимі IVD.

## Обмеження процедури

1. Використовувати лише для діагностики *in vitro*.
2. Застосунок DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx у поєднанні з відповідними реагентами (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) та Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)) здатен забезпечувати такі показники:
  - Вихідні дані секвенування:
    - $\geq 1,0$  терабайт (ТБ) із набором S2
    - $\geq 3,0$  ТБ із набором S4
  - Довжина зчитування (у парному кінцевому прогоні)  $2 \times 150$  пар основ (п. о.).
  - Основ з показником Q понад 30 (Q30)  $\geq 85\%$  за довжини зчитування  $2 \times 150$  п. о. Щонайменше  $85\%$  основ, які мають оцінки якості за шкалою Phred більше ніж 30, що вказує на точність розпізнавання основ більше ніж  $99,9\%$ .
3. Інсерції довжиною  $>18$  п. о. і делеції довжиною  $>21$  п. о. не було валідовано.
4. Великі варіанти, зокрема багатонуклеотидні варіанти (MNV) і великі індели, можуть звітуватися як окремі менші варіанти у вихідному файлі VCF.
5. Невеликі MNV повідомляються у вихідному VCF-файлі як окремі варіанти.
6. Делеції повідомляються у VCF-файлі в координаті попередньої основи відповідно до формату VCF. Тому, перш ніж повідомляти про окреме розпізнавання основи як про гомозиготний еталонний варіант, розгляньте суміжні варіанти.
7. Обмеження, що стосуються варіантів зародкової лінії.
  - Секвенатор NovaSeq 6000Dx із використанням робочого процесу аналізу для генерування файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx розроблений для отримання якісних результатів виявлення варіантів зародкової лінії (наприклад, гомозигота, гетерозигота, дикий тип).
  - Варіація числа копій може впливати на визначення варіанта гомозиготним чи гетерозиготним.
  - Система не повідомлятиме більше двох варіантів в одному локусі, навіть за наявності варіації числа копій.
8. Обмеження, що стосуються соматичних варіантів.
  - Секвенатор NovaSeq 6000Dx із використанням робочого процесу аналізу для генерування файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx розроблений для надання якісних результатів розпізнавання соматичних варіантів (тобто наявності соматичного варіанта).

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- Робочий процес аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF соматичних варіантів не може відрізнити гермінальні варіанти від соматичних. Робочий процес призначений для виявлення варіантів у діапазоні частот варіанта, але частоту варіанта не можна використовувати для розрізнення соматичних і гермінальних варіантів.
- Нормальна тканина в зразку впливає на виявлення варіантів. Зареєстрована межа виявлення базується на частоті варіанта відносно загальної ДНК, екстрагованої як із пухлини, так і з нормальної тканини.
- Якщо в тому самому локусі визначено більше одного варіантного алеля, жоден із цих алелів не буде визнано варіантом, що проходить. Натомість буде повідомлено повний набір алелів, але його буде відфільтровано за тегом «multiallelic» (мультиалельний).

## Процедури контролю якості

Програмне забезпечення NovaSeq 6000Dx оцінює кожний прогін, зразок і розпізнавання основ за показниками контролю якості. Під час підготовки бібліотеки рекомендовано використовувати позитивні та негативні контролю, які слід проаналізувати. Оцінка контролів описана далі.

- Негативний контроль (контроль без додавання матриці) або інший негативний контроль — має генерувати прогнозований результат. Якщо негативний контроль генерує результат, відмінний від прогнозованого, це може свідчити про помилку у відстеженні зразка, неправильне записування індексних праймерів або забруднення.
- Позитивний контрольний зразок — має генерувати прогнозований результат. Якщо позитивний контроль генерує результат, відмінний від прогнозованого, це може свідчити про помилку у відстеженні зразка або неправильне записування індексних праймерів.

## Компоненти виробу

Секвенатор Illumina NovaSeq 6000Dx складається з таких компонентів:

1. Секвенатор NovaSeq 6000Dx (№ 20068232 за каталогом)
2. Компоненти програмного забезпечення для секвенатора Секвенатор NovaSeq 6000Dx, зокрема представлені в таблиці далі.

Прикладна програма	Місце встановлення	Функція	Опис
OS NovaSeq	NovaSeq 6000Dx	Контроль роботи секвенатора	Операційне ПЗ OS NovaSeq (NVOS) керує роботою секвенатора під час секвенування й генерує зображення для використання в програмному забезпеченні Real-Time Analysis (RTA).

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Прикладна програма	Місце встановлення	Функція	Опис
Програмне забезпечення для аналізу в режимі реального часу Real-time Analysis (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Первинний аналіз	Програмне забезпечення RTA перетворює зображення, згенероване NVOS для кожного сегмента на цикл прогону секвенування, на файли розпізнавання азотистих основ. Файли розпізнавання азотистих основ є вхідними для модулів застосунку на сервері Illumina DRAGEN для NovaSeq 6000Dx. Прикладне програмне забезпечення RTA не включає інтерфейсу користувача.
Illumina Run Manager	Illumina DRAGEN	Налаштування прогонів і керування ними	Illumina Run Manager забезпечує керування користувачами та секвенатором, містить прикладні програми та дає змогу використовувати модулі вторинного аналізу геномних даних з апаратним прискоренням DRAGEN.

## Умови експлуатації

Докладніше про умови експлуатації див. у розділі «Вимоги до навколишнього середовища» в документі *Документація на продукт NovaSeq 6000Dx*.

Параметр	Норматив
Температура	Підтримуйте температуру в лабораторії в межах від 19 °C до 25 °C (22 °C ± 3 °C). Це діапазон робочих температур секвенатора. Під час прогону навколишня температура не має змінюватися більше ніж на ±2 °C.
Вологість	Підтримуйте відносну вологість без конденсації в межах 20–80 %. Систему слід експлуатувати на робочій висоті до 2000 метрів над рівнем моря.

## Витратні матеріали та обладнання

У цьому розділі наведено все необхідне для прогону секвенування на NovaSeq 6000Dx. Сюди входять витратні матеріали, що постачаються Illumina, а також допоміжні витратні матеріали й обладнання, які потрібно придбати в інших постачальників. Ці матеріали потрібні для виконання протоколу, а також для процедур технічного обслуговування та пошуку та усунення несправностей.

Інформацію про символи на витратних матеріалах або на їхньому пакуванні див. у розділі [Пояснення символів Illumina IVD \(документ № 1000000039141\)](#).

## Витратні матеріали для секвенування

Для прогону на секвенаторі NovaSeq 6000Dx потрібні такі компоненти:

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- картридж із буферами;
- картридж кластеризації;
- проточна кювета;
- пробірка з бібліотекою;
- картридж SBS.

Витратні матеріали NovaSeq 6000Dx постачаються в наведених нижче конфігураціях. Для кожного компонента використовується радіочастотна ідентифікація (RFID) для точного відстеження витратних матеріалів і сумісності.

Таблиця 1. Витратні матеріали, що постачає компанія Illumina

Назва набору	Вміст	Номер за каталогом Illumina
Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)	Картридж кластеризації S2 Проточна кювета S2 Картридж SBS S2	20046931
Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)	Картридж кластеризації S4 Проточна кювета S4 Картридж SBS S4	20046933
Картридж NovaSeq 6000Dx із буферами S2	Картридж із буферами S2	20062292
NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge	Картридж із буфером S4	20062293
NovaSeq 6000Dx Library Tube	Одна пробірка з бібліотекою	20062290
NovaSeq 6000Dx Library Tube, упаковка з 24 шт.	24 пробірки з бібліотекою	20062291

Отримавши витратні матеріали, негайно помістіть компоненти на зберігання за вказаної температури, щоб вони працювали належним чином.

Таблиця 2. Зберігання набору NovaSeq 6000Dx

Витратний матеріал	Кількість	Температура зберігання	Довжина	Ширина	Висота
Проточна кювета	1	Від 2 °C до 8 °C	27,7 см (10,9 дюйма)	17 см (6,7 дюйма)	3,8 см (1,5 дюйма)
Картридж кластеризації	1	Від -25 °C до -15 °C	29,5 см (11,6 дюйма)	13 см (5,1 дюйма)	9,4 см (3,7 дюйма)
Картридж SBS	1	Від -25 °C до -15 °C	30 см (11,8 дюйма)	12,4 см (4,9 дюйма)	11,2 см (4,4 дюйма)
Картридж із буфером	1	Від 15 до 30 °C	42,2 см (16,6 дюйма)	20,6 см (8,1 дюйма)	21,1 см (8,3 дюйма)



# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Витратний матеріал	Кількість	Температура зберігання	Довжина	Ширина	Висота
Пробірка з бібліотекою	1	Від 15 до 30 °C	4,1 см (1,6 дюйма)	2,3 см (0,9 дюйма)	12,4 (4,9 дюйма)

## Інформація про витратні матеріали

Для визначення сумісності компонентів набору проточні кювети й картриджі промарковано символами, що позначають тип набору.

Таблиця 3. Маркування сумісності

Режим набору	Маркування на етикетці	Опис
Компоненти набору S2		Проточні кювети S2 забезпечують до 4,1 мільярда одиночних зчитувань, що проходять фільтр, з виходом до 1000 Гб за 2 × 150 п. о. Проточна кювета S2 дає змогу виконувати швидке секвенування для завдань, що потребують найбільшої продуктивності.
Компоненти набору S4		Проточні кювети S4 забезпечують до 10 мільярдів одиночних зчитувань, що проходять фільтр, з виходом до 3000 Гб за 2 × 150 п. о. Проточна кювета S4 — це варіант проточної кювети з чотирма доріжками, який розроблено для забезпечення максимального виходу даних.

## Проточна кювета

Проточна кювета NovaSeq 6000Dx — це структурована проточна кювета, вкладена в картридж.

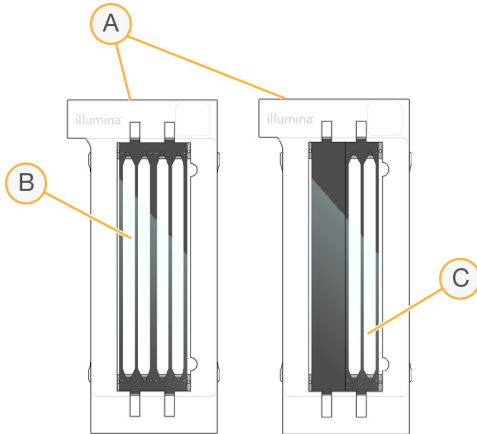
Проточна кювета — це підкладка на скляній основі, що містить мільярди нанолунок, розташованих у певному порядку. У нанолунках формуються кластери, на основі яких проводиться секвенування.

Кожна проточна кювета має декілька доріжок для секвенування об'єднаних бібліотек. Проточна кювета S2 має дві доріжки, а проточна кювета S4 — чотири. Кожна доріжка візуалізується у вигляді численних смуг, зображення яких програмне забезпечення потім ділить на менші частини, які називаються сегментами.

Наявність незначних подряпин і дрібних косметичних дефектів на проточній кюветі є нормальним явищем і не впливає на якість і кількість даних. Компанія Illumina рекомендує використовувати такі проточні кювети як зазвичай.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Рисунок 1. Проточні кювети



- A. Картридж проточної кювети
- B. Проточна кювета з чотирма доріжками (S4)
- C. Проточна кювета з двома доріжками (S2)

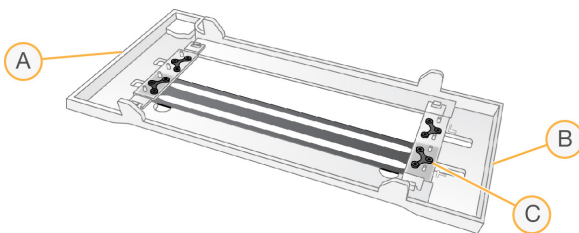
На нижній стороні кожної проточної кювети є декілька прокладок. Бібліотеки й реагенти потрапляють на доріжки проточної кювети через прокладки на вхідному кінці проточної кювети. Використані реагенти виводяться з доріжок через прокладки на вихідному кінці.



## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Не торкайтеся прокладок під час роботи з проточною кюветою.

Рисунок 2. Перевернута проточна кювета



- A. Вихідна сторона
- B. Вхідна сторона
- C. Прокладка (одна з чотирьох)

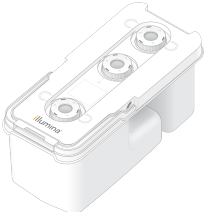


# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Відомості про картриджі з буфером, картриджі з реагентами для кластеризації та картриджі SBS

Картриджі з буфером, картриджі з реагентами для кластеризації та картриджі SBS NovaSeq 6000Dx мають запаяні фольгою резервуари, попередньо заповнені реагентами, буферами та розчинами для промивання. Картриджі кластеризації та картриджі SBS включені у набори реагентів NovaSeq 6000Dx. Картриджі з буфером продаються окремо.

Картриджі завантажуються безпосередньо в секвенатор і мають колірне кодування та маркування, щоб зменшити кількість помилок під час завантаження. Напрямні в охолоджувачі реагентів і шухлядках для буферних розчинів забезпечують правильне встановлення.

Таблиця 4. Картриджі NovaSeq 6000Dx

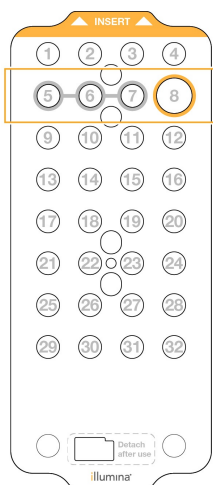
Витратний матеріал	Опис
Картридж із буфером	<p>Попередньо заповнений буферами для секвенування, вагою до 6,8 кг (15 фунтів). Завдяки пластиковому руків'ю можна легко переносити, завантажувати й вивантажувати.</p>  <p>Картридж із буферами містить реактиви, чутливі до світла. До використання зберігайте контейнер з буферами в упаковці.</p>
Картридж кластеризації	<p>Попередньо заповнений реагентами для кластеризації, індексування та прогонів із секвенування парних кінцевих фрагментів, а також розчином для промивання. Має спеціальне місце для пробірки з бібліотекою. Маркування помаранчевим кольором дає змогу відрізнити картридж із реагентами для кластеризації від картриджа SBS.</p>  <p>Реагент для денатурації в резервуарі № 30 містить формамід, який є органічним амідом, токсичним для репродуктивної системи. Щоб полегшити безпечну утилізацію будь-якого невикористаного реагенту після прогону секвенування, цей резервуар можна зняти.</p>
Картридж SBS	<p>Попередньо заповнені об'єми реагентів для секвенування, що відповідають кількості циклів, які підтримує набір. Кожне з трьох положень для реагентів має суміжне положення, зарезервоване для автоматичного промивання після прогону. Маркування сірим кольором дає змогу відрізнити картридж SBS від картриджа з реагентами для кластеризації.</p>  <p>Картридж SBS містить реактиви, чутливі до світла. До використання зберігайте контейнер SBS в упаковці.</p>

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Віділені резервуари картриджа для кластеризації

Три резервуари відведено для користувацьких праймерів, а порожнє місце відведено для пробірки з бібліотекою. Для можливості відстежувати зразки пробірка з бібліотекою завантажується в картридж із реагентами для кластеризації під час налаштування прогону й залишається в картриджі до кінця прогону.

Рисунок 3. Пронумеровані резервуари



Таблиця 5. Резервуари картриджа з реагентами для кластеризації

Позиція	Призначення
5, 6 і 7	Додаткові користувацькі праймери
8	Пробірка з бібліотекою

## Витратні матеріали й обладнання, що замовляє користувач

Таблиця 6. Витратні матеріали

Витратний матеріал	Постачальник	Призначення
Центрифужна пробірка, 500 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Для розведення Tween 20 для сервісного промивання.
Центрифужна пробірка, 30 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Для розведення NaOCl для сервісного промивання.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Витратний матеріал	Постачальник	Призначення
Одноразові рукавички, неопудрені	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Загальне використання.
Серветки, просочені ізопропіловим спиртом, 70 % чи Серветки з етанолом, 70 %	VWR, № за каталогом 95041-714 або еквівалент Постачальник загальнолабораторного обладнання	Для очищення компонентів перед прогоном і загального призначення.
Лабораторна серветка з низьким виділенням ворсу	VWR, № 21905-026 за каталогом, або еквівалентний	Для висушування столика проточної кювети та загального призначення.
NaOCl реактивної чистоти, 5 %	Sigma-Aldrich, № 239305 за каталогом	Для виконання сервісного промивання.
Наконечники для піпеток, 2 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Піпетування для розведення та завантаження бібліотек.
Наконечники для піпеток, 20 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Піпетування для розведення та завантаження бібліотек.
Наконечники для піпеток, 200 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Піпетування для розведення та завантаження бібліотек.
Наконечники для піпеток, 1000 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Піпетування для розведення та завантаження бібліотек.
Ізопропіловий спирт реактивної або спектрофотометричної чистоти (99 %), флакон 100 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Для періодичного очищення оптичних компонентів і використання з картриджем для очищення об'єктива.
Tween 20	Sigma-Aldrich, № P7949 за каталогом	Для виконання сервісного промивання.
Вода для застосування в лабораторіях	Постачальник загальнолабораторного обладнання	Для розведення Tween 20 і гіпохлориту натрію для сервісного промивання.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Таблиця 7. Обладнання

Найменування	Джерело
Морозильна камера, від -25 °C до -15 °C	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Мірний циліндр, 500 мл, стерильний	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Контейнер із льодом	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Піпетка, 20 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Піпетка, 200 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Піпетка, 1000 мкл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Холодильник, від 2 °C до 8 °C	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Ємність, водяні бані*	Постачальник загальнолабораторного обладнання

\* Використовуйте ємність, у яку вміщуються два картриджі з реагентами та відповідний об'єм води. Наприклад, 61 см × 91,4 см × 25,4 см (24 дюйми × 36 дюймів × 10 дюймів).

## Рекомендації стосовно води лабораторної якості

Для виконання процедур на секвенаторі завжди використовуйте воду лабораторної якості або деіонізовану воду. Використання водопровідної води заборонено. Використовуйте тільки наведені нижче класи води або їхні еквіваленти.

- Деіонізована вода;
- Illumina PW1;
- вода 18 мегаом (МОм);
- вода Milli-Q;
- вода Super-Q;
- вода для молекулярно-біологічного застосування.

## Інструкція із застосування

Наведені нижче інструкції призначені для роботи із секвенатором Секвенатор NovaSeq 6000Dx у режимі IVD з використанням наборів конфігурації S2 або S4.

## Створення прогону секвенування

Виконайте наведені нижче дії для створення прогону, використовуючи Illumina Run Manager у режимі IVD або RUO. Як варіант, виберіть **Import Run** (Імпортувати прогін) у вкладці Planned (Заплановані) на сторінці Runs (Прогони) та імпортуйте протокол аналізу. Створіть нові прогони на секвенаторі або через Illumina Run Manager у браузері на підключеному до мережі комп'ютері.

**ПРИМ.** Точна інформація, необхідна для кожного аналітичного застосунку, відрізняється, але процес створення прогону складається з наведених нижче етапів.

1. На вкладці Planned (Заплановані) екрана Runs (Прогони) виберіть **Create Run** (Створити прогін).
2. Виберіть програму, а потім натисніть **Next** (Далі).
3. Перейдіть до екранів налаштувань. Залежно від вашого застосунку, можуть відобразитися такі екрани:
  - **Run Settings** (Параметри прогону — введіть параметри прогону.
  - **Sample Data** (Дані зразка) — введіть дані зразків вручну або шляхом імпорту файлу CSV, що містить інформацію про зразки. Назви зразків повинні бути унікальними.
  - **Analysis settings** (Параметри аналізу) — введіть параметри аналізу.
4. На екрані Review (Огляд) перевірте інформацію про прогін і натисніть **Save** (Зберегти). Прогін буде додано до початку списку прогонів у вкладці Planned (Заплановані).

## Підготовка витратних матеріалів

Розморожування картриджів SBS і картриджів із реагентами для кластеризації



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

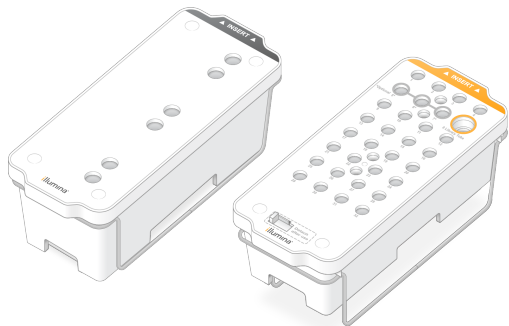
Використання гарячої води для розморожування реагентів може призвести до зниження якості даних або помилки прогону.

1. Якщо прогін секвенування вже в процесі виконання, подбайте про те, щоб обидві сторони секвенатора були доступні після завершення розморожування.
2. Вийміть картриджі SBS і картриджі з реагентами для кластеризації з місця зберігання, у якому підтримується температура від -25 °C до -15 °C.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

3. Покладіть кожен картридж у дротяну решітку для розморожування. Решітки поставляються в комплекті з секвенатором і запобігають перекиданню картриджів у водяній бані.

Рисунок 4. Картриджі в дротяних решітках для розморожування



4. Скористайтесь таблицею для визначення тривалості розморожування. Розморозьте SBS і картриджі для кластеризації на водяній бані кімнатної температури (від 19 °C до 25 °C), як зазначено нижче. Занурте картриджі приблизно наполовину.

Картридж	Тривалість розморожування
Картридж SBS S2	4 години
Картридж кластеризації S2	до 2 годин
Картридж S4 SBS	4 години
Картридж кластеризації S4	до 4 годин



## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Якщо не почати секвенування протягом чотирьох годин після розморожування картриджів із реагентами, це може призвести до погіршення якості даних.

5. Ретельно просушіть денця картриджів за допомогою паперових рушників. Насухо витріть проміжки між лунками, прибравши всю воду.
6. Перевірте ущільнення з фольги: на ньому не повинно бути води. Якщо на ньому є вода, витріть його безворсовою серветкою.
7. Огляньте нижню частину кожного картриджа, щоб переконатися, що на резервуарах немає льоду. Це свідчить про те, що реагенти розморожені.
8. Переверніть кожен картридж 10 разів для перемішування реагентів.



## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Якщо ретельно не перевернути картриджі, це може призвести до погіршення якості даних.

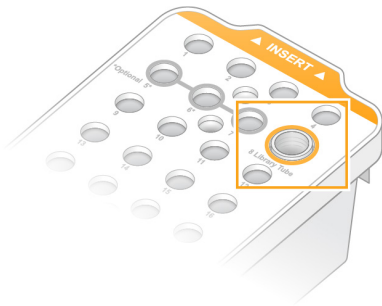
# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

9. Обережно постукайте дном кожного картриджа по столу, щоб зменшити кількість бульбашок повітря.

## Завантаження пробірки з бібліотекою

1. Не струшуючи бібліотеки, зібрані в нижній частині, вставте пробірку з бібліотекою без ковпачка в положення № 8 **Library Tube** (Пробірка з бібліотекою) картриджа з реагентами для кластеризації.
2. Вставте пробірку з бібліотекою в положення № 8 картриджа з реагентами для кластеризації.

Рисунок 5. Пробірка з бібліотекою без ковпачка завантажена в положення № 8



## Спорожнення пляшок для використаних реагентів

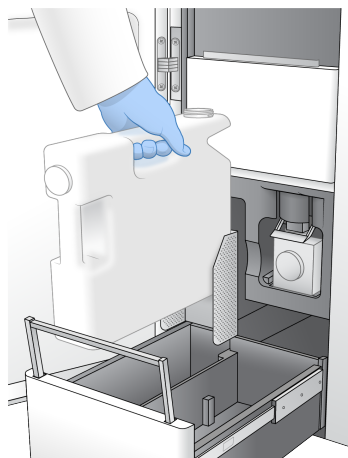
Користуйтеся наведеними нижче вказівками, щоб спорожнювати пляшки для використаних реагентів під час *кожного* прогону секвенування. Якщо систему налаштовано на зовнішнє відведення використаних реагентів, мала пляшка збирає використані реагенти, і її потрібно спорожнювати під час кожного прогону секвенування. Велика пляшка має стояти на місці.

1. Вийміть і спорожніть малу пляшку для використаних реагентів як наведено нижче.
  - a. Підніміть важіль і вийміть малу пляшку для використаних реагентів із ніші. Тримайте пляшку за боки.
  - b. Зніміть гвинтовий ковпачок із тримача ковпачка на передній частині пляшки.
  - c. Закрийте отвір пляшки ковпачком, щоб запобігти проливанню.
  - d. Не змішуючи вміст із вмістом іншої пляшки, утилізуйте його відповідно до чинних норм свого регіону.
  - e. Поверніть пляшку без ковпачка в нішу, а потім опустіть важіль. Зберігайте ковпачок на тримачі ковпачка.
2. Вийміть і спорожніть велику пляшку для використаних реагентів як наведено нижче.
  - a. Тримуючись за верхню ручку, вийміть велику пляшку для використаних реагентів із лівого боку буферної шухлядки.
  - b. Зніміть гвинтовий ковпачок із тримача ковпачка на передній частині пляшки.
  - c. Закрийте отвір пляшки ковпачком, щоб запобігти проливанню.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- d. Утилізуйте вміст відповідно до чинних норм вашого регіону. Під час спорожнення пляшки тримайте її за обидві ручки.
- e. Поверніть пляшку без ковпачка в буферну шухлядку. Зберігайте ковпачок на тримачі ковпачка.

Рисунок 6. Повернення порожньої пляшки



3. Одягніть нову пару неопудрених рукавичок.



## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Завжди надягайте нову пару рукавичок після роботи з використаною пляшкою з реагентом.

4. Закрийте буферну шухлядку, а потім закрийте дверцята відсіку для рідин.



## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Якщо не спорожнити пляшки для використаних реагентів, це може призвести до аварійного завершення прогону та переливання рідини, що пошкоджує секвенатор і створює загрозу безпеці.

## Підготовка проточної кювети

1. Вийміть коробку з новою проточною кюветою з місця для зберігання, у якому підтримується температура від 2 °C до 8 °C.
2. Відкладіть герметичне пакування проточної кювети на 10–15 хвилин для досягнення навколишньої температури (від 19 °C до 25 °C).  
Використайте проточну кювету впродовж 12 годин після того, як вийняли її з пакування.

## Завантаження витратних матеріалів

Щоб розпочати налаштування прогону та завантажити витратні матеріали, дотримуйтеся наведених нижче вказівок.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

1. У головному меню виберіть **Sequence** (Секвенування), а потім — прогін з однією або двома проточними кюветами таким чином.

- **A + B** — налаштувати прогін із двома проточними кюветами.
- **A** — налаштувати прогін з однією проточною кюветою на боці А.
- **B** — налаштувати прогін з однією проточною кюветою на боці В.

Система ініціює налаштування прогону, починаючи із завантаження проточної кювети.

2. Щоб підтвердити попередження та відкрити дверцята проточної кювети, виберіть **ОК**.



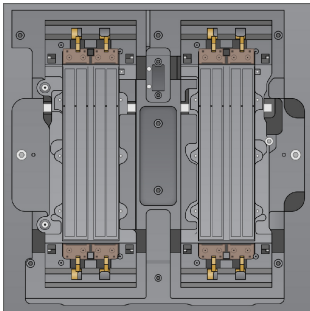
## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Під час прогону секвенування нічого не ставте на поверхню секвенатора і не спирайтеся на нього. Тиск на дверцята проточної кювети може спричинити їх відкриття, що призведе до зупинки прогону. Зупинені прогони відновити неможливо.

## Завантаження проточної кювети

1. Вийміть використану проточну кювету, якщо вона залишилась після попереднього прогону.
2. Якщо на столику проточної кювети видно частинки, очистьте всю платформу, зокрема інтерфейс рідинної системи і скляну поверхню мішені оптичного вирівнювання, спиртовою серветкою. Витріть безворсовою серветкою.

Рисунок 7. Столик проточної кювети

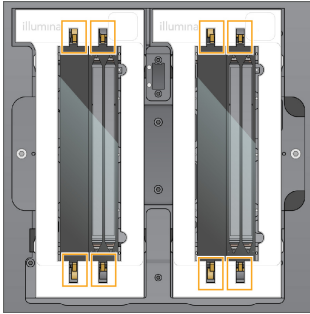


3. Вийміть проточну кювету з упаковки, як описано нижче.
  - a. Надягніть нову пару неопудрених рукавичок, щоб не забруднити скляну поверхню проточної кювети.
  - b. Покладіть упаковку на рівну поверхню й відкрийте фольгу, потягнувши за язичок у куті.
  - c. Зніміть прозорий пластиковий фіксатор, що закриває проточну кювету.
  - d. Вийміть проточну кювету з упаковки. Беріть проточну кювету за боки, щоб не торкатися скла або нижніх ущільнювачів.
  - e. Якщо на будь-якій зі скляних поверхонь видно частинки, очистьте відповідну поверхню безворсовою спиртовою серветкою та висушіть лабораторною серветкою з низьким вмістом ворсу.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- f. Утилізуйте упаковку належним чином.
4. Вирівняйте проточну кювету над чотирма піднятими затискачами й покладіть її на столик проточної кювети.

Рисунок 8. Завантажені проточні кювети, вирівняні над затискачами



5. Виберіть **Close Flow Cell Door** (Закрити дверцята проточної кювети).  
Дверцята проточної кювети зачиняються, датчики та RFID перевіряються, а на екрані з'являється ідентифікатор проточної кювети.

## Завантаження картриджів SBS і кластеризації

1. Відкрийте дверцята відсіку для рідин, а потім — дверцята охолоджувача реагентів.
2. Вийміть використані картриджі SBS і картриджі з реагентами для кластеризації, якщо вони залишилися з попереднього прогону.  
У використаних картриджів фольгові мембрани вже проколоті.
3. Утилізуйте невикористаний вміст відповідно до чинних норм.  
Вказівки щодо безпечної утилізації позиції № 30 картриджа кластеризації див. у розділі [Від'єднання позиції № 30](#) на стор. 22.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- Завантажте підготовлені картриджі в охолоджувач реагентів, як описано далі, так щоб етикетки з написом Insert (Вставити) було повернуто до задньої частини секвенатора.
  - Помістіть картридж SBS (сіра етикетка) у ліву позицію.
  - Помістіть картридж кластеризації (помаранчева етикетка), що містить пробірку з бібліотекою без ковпачка, у праву позицію.

Рисунок 9. Завантажені картриджі з реагентами



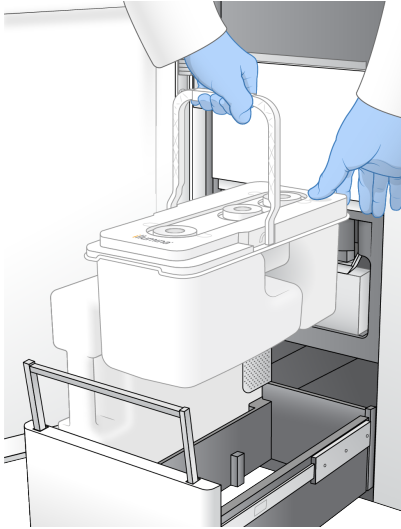
- Засуньте шухлядку в охолоджувач, а потім закрийте дверцята охолоджувача реагентів. Виконується перевірка датчиків і RFID. На екрані з'являються ідентифікатори пробірки з бібліотекою та двох картриджів.

## Завантаження буферного картриджа

- Потягніть за металеву ручку, щоб відкрити буферну шухлядку.
- Вийміть використаний буферний картридж з правого боку буферної шухлядки. У використаного буферного картриджа фольгова мембрана вже проколота.
- Помістіть новий буферний картридж у буферну шухлядку так, щоб етикетка Illumina була звернена до передньої частини шухлядки. Вирівняйте картридж за піднятими напрямними на дні та з боків шухлядки. Якщо картридж завантажено правильно, він сидить рівно, і шухлядка легко зачиняється.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Рисунок 10. Завантаження буферного картриджа



4. Якщо обидві пляшки для використаних реагентів спорожнено, установіть прапорець на підтвердження того, що обидві пляшки порожні.

**ПРИМ.** Якщо не спорожнити пляшки для використаних реагентів, це може призвести до аварійного завершення прогону та переливання рідини, що пошкоджує секвенатор і створює загрозу безпеці.

5. Після завантаження витратних матеріалів виберіть **Run Selection** (Вибір прогону), щоб продовжити роботу.

## Вибір і запуск

Секвенатор сканує ідентифікатор пробірки з бібліотекою та шукає відповідний запланований прогін.

1. Якщо для кожного задіяного боку знайдено запланований прогін, що відповідає ідентифікатору пробірки з бібліотекою, етап вибору прогону пропускається. Щоб продовжити роботу, виберіть **Review** (Перегляд).
2. Якщо відповідний прогін для однієї або обох сторін відсутній, натисніть **Run Selection** (Вибір прогону), а потім виберіть один або кілька запланованих прогонів.  
Той самий запланований прогін не можна вибрати для обох боків.
3. Після вибору одного або кількох прогонів виберіть **Pre-Run Checks** (Передпускові перевірки).
4. Зачекайте приблизно 5 хвилин, доки не завершиться передпускова перевірка.  
Після успішного завершення перевірки прогін розпочинається автоматично.

**ПРИМ.** Щоб не переповнити жорсткий диск, після початку прогону не копіюйте жодних даних на диск C:\.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Помилки передпускової перевірки

1. Якщо передпускові перевірки не пройдено через помилку датчика (наприклад, якщо проточну кювету не виявлено), потрібно вийти з робочого процесу й запустити його знову.
2. У разі інших збоїв передпускової перевірки виберіть **Retry** (Повторити), щоб повторно запустити перевірку, яка не вдалася, або **Retry All** (Повторити все), щоб повторно запустити всі перевірки. Перед початком прогону всі помилки слід усунути.
3. Щоб переглянути відомості про помилку, виберіть піктограму **Error** (Помилка).
4. Якщо перевірка вирівнювання не пройдена, усуньте помилку, як описано нижче.
  - a. Виберіть **Reload** (Перезавантажити), а потім **OK**, щоб повернутися на екран завантаження.
  - b. Приберіть усі предмети з верхньої частини секвенатора, а потім виберіть **OK**. Відкриються дверцята проточної кювети.
  - c. Повторно завантажте проточну кювету, а потім виберіть **Run Setup** (Налаштування прогону).
  - d. Послідовно пройдіть кожен екран, щоб повторно зчитати кожен мітку RFID, а потім поверніться на екран Pre-Run Checks (Передпускові перевірки).
  - e. Повторіть перевірку.

## Відстеження виконання циклу

Під час виконання прогону на екрані Sequencing (Секвенування) відображаються наведені нижче відомості. Доступ до екрана Sequencing (Секвенування) здійснюється через головне меню.






- **Стан окремих етапів прогону**
- **Time to completion** (Час до завершення) — дата й час завершення прогону (rrrr-мм-дд гг:хх).
- **Run progress** (Перебіг прогону) — поточний етап прогону. Розмір індикатора виконання не пропорційний швидкості проходження кожного етапу.
- **Q-scores** (Q-показники) — розподіл показників якості (Q-показників).
- **Intensity** (Інтенсивність) — значення інтенсивності кластерів для 90-го перцентиля для кожного сегмента. Кольори графіка позначають червоний і зелений канали.
- **Clusters passing filter (%)** (Кластери, що проходять фільтр (%)) — відсоток кластерів, що проходять фільтр.
- **Projected Total Yield (GB)** (Прогнозований загальний вихід (GB)) — прогнозований вихід для прогону проточної кювети. Якщо вибрано відображення показників для однієї доріжки (H), відображені значення є поточним виходом для кожної доріжки й оновлюються в кожному циклі протягом прогону.
- **Q30** — відсоток визначень основ у межах прогону, для яких Q-показник становить  $\geq 30$ .

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Значки стану

Піктограма стану в інтерфейсі NVOС указує на стан прогону. Цифра на значку позначає кількість умов для стану.

Коли стан прогону змінюється, піктограма блимає. Виберіть значок, щоб переглянути опис стану. Щоб прибрати повідомлення, виберіть **Acknowledge** (Підтвердити), а потім — Close (Закрити), щоб закрити діалогове вікно.

Значок стану	Найменування стану	Опис
	Стан у нормі	Система функціонує нормально.
	Обробка	Система виконує обробку.
	Попередження	З'явилося попередження, що потребує уваги. Попередження не зупиняють прогін і не потребують вжиття заходів перед продовженням роботи.
	Помилка	Сталася помилка. Щоб продовжити прогін, помилки слід усунути.
	Information (Інформація)	Надійшло некритичне повідомлення.

## Показники прогону

Програмне забезпечення відображає показники, згенеровані під час прогону. Показники відображаються у вигляді графіків, діаграм і таблиць на основі даних, сформованих RTA3 та записаних у файли InterOp.

Кластеризація триває приблизно 2 години, після чого секвенування починається з циклу 1. Показники оновлюються в міру виконання секвенування. Інформація про кластери, що пройшли фільтр, вихід і показники якості доступна після циклу 26. До циклу 26 жодні значення не заповнюються й позначаються як незастосовні.

## Після завершення секвенування

У розділах нижче наведено вказівки щодо дій, які виконують після завершення секвенування.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Автоматичне промивання після прогону

Після прогону секвенування програмне забезпечення запускає автоматичне промивання, яке триває приблизно 80 хвилин. Система подає 0,24 % гіпохлориту натрію (NaOCl) з позиції № 17 і розводить його до концентрації 0,12 %. 0,12 % NaOCl подається до позицій реагенту ExAmp і бібліотеки, проходить через проточну кювету, а потім надходить у пляшки для використаних реагентів. Під час промивання матриця вимивається із системи, щоб запобігти перехресній контамінації.

Після завершення промивання система переходить у безпечний стан, а кнопка Home (Головний екран) стає активною. Залиште витратні матеріали на місці до наступного прогону. Після промивання аспіратори залишаються в картриджах SBS і кластеризації, щоб запобігти потраплянню повітря в систему. Аспіратори в буферному картриджі піднімаються, щоб можна було спорожнити пляшки для використаних реагентів. Потім через усі магістралі прокачують буфер для промивання, щоб видалити із системи NaOCl та реагенти.

**ПРИМ.** Якщо під час автоматичного промивання після прогону сталася помилка і це промивання не було завершено, необхідно виконати сервісне промивання.

## Від'єднання позиції № 30

Резервуар у позиції № 30 картриджа кластеризації містить формамід. Його виймають із використаного картриджа кластеризації та утилізують окремо.



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

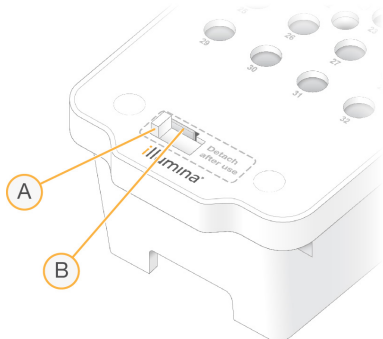
**Цей набір реагентів містить потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може завдати шкоди здоров'ю. Надягайте захисне приладдя, зокрема засоби захисту очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосованих регіональних, державних і місцевих законів та нормативних правил. Щоб отримати додаткову інформацію про захист навколишнього середовища, здоров'я та безпеку, див. SDS (Паспорт безпеки продукції) на сторінці [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

1. Надягнувши рукавички, посуňte праворуч білий пластиковий фіксатор із написом **Detach after use** (Від'єднати після використання).
2. Підставте під резервуар руку або тверду поверхню та зсуньте прозорий пластиковий фіксатор у напрямку позначки Illumina, щоб зняти резервуар з-під картриджа кластеризації.

**ПРИМ.** Під час зберігання не складайте картриджі кластеризації один на один. Таке складання може призвести до випадкового від'єднання резервуара.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Рисунок 11. Знімна позиція № 30



- A. Білий пластиковий фіксатор для від'єднання резервуара
- B. Прозорий пластиковий фіксатор для зняття резервуара

3. Утилізуйте резервуар відповідно до чинних норм.

## Вихідні дані секвенування

Під час секвенування дані автоматично передаються із секвенатора Секвенатор NovaSeq 6000Dx на сервер Illumina DRAGEN. Після завершення первинного аналізу й передачі даних може автоматично розпочатися вторинний аналіз на сервері Illumina DRAGEN за параметрами аналізу, заданими застосунком, вибраним в Illumina Run Manager. Отримані результати залежать від параметрів, вибраних під час налаштування прогону. Щоб переглянути результати прогону, виберіть потрібну назву прогону у вкладці Completed (Виконано) екрана Runs (Прогони). ви також можете знайти вихідні файли в місці, вказаному на екрані Instrument Settings (Налаштування секвенатора).

## Real-Time Analysis

На секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx встановлено RTA3 — програмне забезпечення Real-Time Analysis, реалізоване на обчислювальному ядрі секвенатора. RTA3 визначає інтенсивність за зображеннями, отриманими з фотокамери, виконує розпізнавання азотистих основ, призначає оцінку якості для розпізнавання основ, суміщає з PhiX і звітує про дані у файлах InterOp.

Для оптимізації часу обробки RTA3 зберігає інформацію в пам'яті. Якщо аналіз RTA3 припинено, обробка не відновиться, а дані циклу, що обробляються в пам'яті, будуть втрачені.

## Вхідні дані RTA3

RTA3 потребує обробки зображень сегментів, що містяться в локальній пам'яті системи. RTA3 отримує інформацію про цикл і команди через NVOS.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Вихідні дані RTA3

Зображення для кожного колірної каналу передаються в пам'ять RTA3 як сегменти. Із цих зображень RTA3 створює вихідні дані у вигляді набору файлів розпізнаних азотистих основ і файлів фільтрованих даних з присвоєними показниками якості. Усі інші вихідні дані підтримують файли вихідних даних.

Тип файлу	Опис
Файли розпізнаних азотистих основ	Кожен сегмент, що аналізується, включається у стиснутий файл розпізнавання основ (*.cbcl). Сегменти з однієї доріжки та поверхні агрегуються в один файл CBCL для кожної доріжки та поверхні.
Файли фільтрованих даних	Кожен сегмент створює файл фільтрації (*.filter), який визначає, чи пройшов кластер фільтри.

RTA3 надає метрики якості прогону в реальному часі, які зберігаються у файлах InterOp — бінарних вихідних даних, що містять показники на рівні сегмента, циклу та зчитування.

## Обробка помилок

RTA3 створює файли журналу й записує їх у папку Logs (Журнали). Помилки записуються в текстовий файл у форматі \*.log.

Зазначені нижче файли журналу передаються до кінцевого місця призначення вихідних даних наприкінці обробки.

- `info_00000.log` підсумовує важливі події прогону.
- У файл `error_00000.log` вносяться помилки, що виникли під час виконання прогону.
- У файл `warning_00000.log` вносяться попередження, що виникли під час виконання прогону.

## Сегменти проточної кювети

Сегменти — це невеликі ділянки візуалізації на проточній кюветі. Камера робить одне зображення кожної смуги, яке програмне забезпечення ділить на сегменти для обробки RTA3. Загальна кількість сегментів залежить від кількості доріжок, смуг і поверхонь, що візуалізуються на проточній кюветі.

- Проточні кювети S2 мають загалом 1408 сегментів.
- Проточні кювети S4 мають загалом 3744 сегменти.

Компонент проточної кювети	S2	S4	Опис
Доріжки	2	4	Доріжка — це фізичний канал із вхідними та вихідними портами.
Поверхні	2	2	Проточні кювети S2 і S4 візуалізуються з двох поверхонь: верхньої та нижньої. Спочатку зображується верхня поверхня сегмента.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Компонент проточної кювети	S2	S4	Опис
Смуг на доріжку	4	6	Смуга — це стовпець у доріжці проточної кювети, який камера захоплює як одне скановане зображення.
Сегментів на ряд	88	78	Сегмент — це частина ряду, яка показує область зображення на проточній кюветі.
Всього згенерованих сегментів	1408	3744	Загальна кількість сегментів дорівнює: смуги × поверхні × ряди × сегменти на ряді

Назва сегмента — це п'ятизначне число, яке позначає його положення на проточній кюветі. Наприклад, назва сегмента 1\_1205 означає доріжку 1, верхню поверхню, смугу 2, сегмент 5.

- Перша цифра — це номер доріжки:
  - 1 або 2 для проточної кювети S2.
  - 1, 2, 3 або 4 для проточної кюветі S4.
- Друга цифра позначає поверхню: 1 — верхня, 2 — нижня.
- Третя цифра позначає номер смуги:
  - 1, 2, 3 або 4 для проточної кювети S2.
  - 1, 2, 3, 4, 5 або 6 для проточної кювети S4.
- Дві останні цифри відповідають номеру сегмента. Нумерація починається з 01 на вихідному кінці проточної кювети й триває до 88 або 78 на вхідному кінці.
  - Від 01 до 88 для проточної кювети S2.
  - Від 01 до 78 для проточної кювети S4.

## Робочий процес Real-Time Analysis



# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Суміщення

Суміщення вирівнює зображення з обернутою квадратною матрицею нанолунок у структурованій проточній кюветі. Через впорядковане розташування нанолунок координати X і Y для кожного кластера в сегменті визначені наперед. Положення кластерів записуються у файл розташування кластерів (s.locs) для кожного циклу обробки.

Якщо для будь-яких зображень у циклі суміщення не виконано, розпізнані азотисті основи для цього сегмента в цьому циклі не генеруються.

## Визначення інтенсивності

Після суміщення процес визначення інтенсивності розраховує значення інтенсивності для кожної нанолунки в певному зображенні. Якщо суміщення не вдалось, інтенсивність для даного сегменту визначити не можна.

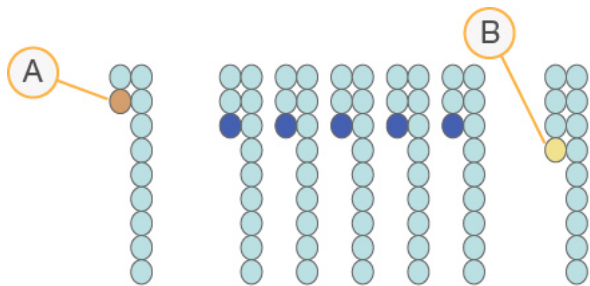
## Корегування фазування

Під час реакції секвенування кожна нитка ДНК в кластері подовжується на одну азотисту основу за цикл. Фазування й попереднє фазування відбуваються, коли нитка не збігається з фазою поточного циклу вбудовування.

Фазування відбувається, коли включення основи відстає.

Префазування відбувається, коли включення основи випереджає цикл.

Рисунок 12. Фазування та попереднє фазування



- A. Зчитування з азотистою основою в стані фазування
- B. Зчитування з азотистою основою в стані попереднього фазування

RTA3 корегує впливи фазування й попереднього фазування, що максимізує якість даних для кожного циклу протягом усього прогону.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

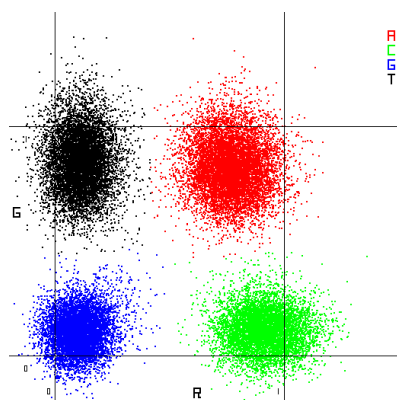
## Визначення основ

Процес розпізнавання визначає азотисту основу (A, C, G або T) для кожного кластера відповідного сегмента конкретного циклу. Секвенатор NovaSeq 6000Dx використовує двоканальне секвенування, для якого достатньо лише двох зображень, щоб закодувати дані для чотирьох основ ДНК: одного зображення із зеленого каналу та одного зображення з червоного каналу.

Нерозпізані основи позначаються літерою N. Таке трапляється, коли кластер не проходить фільтр, не вдається реєстрація або кластер зміщується із зображення.

Значення інтенсивності для кожного кластера витягують із червоного та зеленого зображень і порівнюють між собою, унаслідок чого формуються чотири чітко відмінні популяції. Кожна популяція відповідає основі. Процес розпізнавання азотистих основ визначає, до якої популяції належить кожен кластер.

Рисунок 13. Візуалізація інтенсивності кластерів



Таблиця 8. Розпізнавання азотистих основ у 2-канальному секвенуванні

Азотиста основа	Червоний канал	Зелений канал	Результат
A	1 (увімк.)	1 (увімк.)	Кластери, які показують інтенсивність як у червоному, так і в зеленому каналах.
C	1 (увімк.)	0 (вимк.)	Кластери, які показують інтенсивність тільки в червоному каналі.
G	0 (вимк.)	0 (вимк.)	Кластери, які не показують інтенсивність у відомому розташуванні кластерів.
T	0 (вимк.)	1 (увімк.)	Кластери, які показують інтенсивність тільки в зеленому каналі.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Кластери, що проходять фільтр

Під час циклу обробки RTA3 фільтрує необроблені дані для видалення зчитувань, які не відповідають граничному значенню якості даних. Програма видаляє кластери, що накладаються один на одного, і кластери низької якості.

Для двоканального аналізу RTA3 використовує засновану на популяції систему, що дає змогу визначити чистоту (чистота вимірювання інтенсивності) розпізнавання азотистих основ. Кластери проходять фільтр (PF), коли не більше ніж одне розпізнавання азотистих основ на перші 25 циклів має значення чистоти, що є меншим за встановлений поріг. Вирівнювання PhiX, якщо включене, виконується на циклі 26 на підмножині сегментів тих кластерів, що пройшли фільтр. Для кластерів, що не пройшли фільтр, розпізнавання основ і вирівнювання не проводиться.

## Оцінювання якості

Показник якості (Q-показник) дає можливість прогнозувати ймовірність неправильного розпізнавання азотистої основи. Більші Q-показники означають, що розпізнавання азотистих основ має вищу якість і з більшою ймовірністю правильне. Після визначення Q-показника результати записують у файли SBCL.

Q-показник успішно повідомляє про невеликі ймовірності помилок. Показники якості представлено як Q (X), де X — показник. У таблиці нижче показано зв'язок між показником якості й ймовірністю помилки.

Q-показник Q(X)	Ймовірність помилки
Q40	0,0001 (1 на 10 000)
Q30	0,001 (1 на 1000)
Q20	0,01 (1 на 100)
Q10	0,1 (1 на 10)

## Оцінка якості та звітність

Процес оцінювання якості розраховує набір прогностичних факторів для кожного розпізнавання основ, а потім використовує значення цих прогностичних факторів для визначення Q-показника в таблиці якості. Таблиці якості створюються для забезпечення максимально точних прогностичних показників якості для прогонів, що виконуються за конкретної конфігурації платформи секвенування та версії хімічного аналізу.

Оцінювання якості базується на модифікованій версії алгоритму Phred.

Щоб створити Q-таблицю, з якою може працювати секвенатор Секвенатор NovaSeq 6000Dx, було визначено три групи розпізнаних азотистих основ на підставі кластеризації цих конкретних прогностичних функцій. Після групування розпізнаних азотистих основ середня частота помилок була емпірично розрахована для кожної з трьох груп, а відповідні Q-показники були записані в Q-таблиці разом із прогностичними ознаками, що корелюють із цією групою. Таким чином, у RTA3 можливі лише три Q-показники, і ці Q-показники представляють середню частоту помилок у групі. Загалом це призводить до спрощеної, але дуже точної оцінки якості. Три групи в таблиці якості відповідають

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

визначенням основ граничної (<Q15), середньої (~Q20) та високої якості (>Q30), яким присвоюють конкретні бали 12, 26 і 34 відповідно. Крім того, будь-яким невизначенням присвоюється значення 2. Ця модель звітування Q-показника зменшує простір для зберігання та вимоги щодо пропускну здатності без впливу на точність або продуктивність.

Рисунок 14. Спрощена оцінка Q-показника за допомогою RTA3



## Файли з вихідними даними секвенування

Тип файлу	Опис, розташування та імена файлів
Файли розпізнаних азотистих основ	Кожен проаналізований кластер включено до файлу розпізнавання нуклеотидних основ, об'єднаного в один файл на цикл, доріжку й поверхню. Об'єднаний файл містить дані розпізнавання азотистих основ і закодований показник якості для кожного кластера. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, наприклад L001_1.cbcl
Файли розташування кластерів	Бінарний файл розташування кластерів кожної проточної кювети містить координати XY для кластерів у сегменті. Координати визначаються за гексагональною сіткою, яка відповідає схемі розташування нанолунок проточної кювети. Data\Intensities s_[lane].locs


# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®


Тип файлу	Опис, розташування та імена файлів
Файли фільтрованих даних	Файл фільтрованих даних указує, чи пройшов кластер фільтри. Файли фільтрованих даних створюються на циклі 26 з використанням даних 25 циклів. Для кожного сегмента створюється один файл фільтрованих даних. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Файл інформації про запуск	Містить назву прогону, кількість циклів на зчитування, інформацію про те, чи зчитування проводиться з індексуванням, а також кількість смуг і сегментів на проточній кюветі. Файл інформації про прогін створюється на початку прогону. [Root folder],RunInfo.xml
Файли мініатюр	Мініатюрні зображення для першого циклу кожного зчитування секвенування. Thumbnail_Images\L001\C[X.1] — файли зберігаються в окремій підпапці для кожного циклу. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg — мініатюрне зображення містить номер сегмента.

## Структура папки вихідних даних секвенування

NVOS генерує назву папки вихідних даних автоматично.

 **Config** — параметри конфігурації прогону.


 **Logs** — файли журналу, в яких описано робочі етапи, аналітичні параметри секвенатора та події RTA3.

 SampleSheet.csv — протокол аналізу або інший прикріплений файл, якщо застосовно.


 **Data**

 **Intensities**


 **BaseCalls**

 **L00[X]** — файли розпізнаних азотистих основ (\*.cbcl), об'єднані в один файл на цикл, доріжку й поверхню.

 s.locs — файли розташування кластерів для прогону.

 **InterOp** — двійкові файли.

 **Recipe** — файли з набором параметрів для конкретного прогону.

 **Thumbnail Images** — мініатюри зображень для кожного 10-го сегмента.

 **LIMS** — файл налаштування прогону (\*.json), якщо застосовно.

 **Audit**

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- RunParameters.xml
- RTAComplete.txt
- CopyComplete.txt
- SequenceComplete.txt
- IlluminaRunManagerCopyComplete.txt
- Manifest.tsv

## Попередження та запобіжні заходи



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Федеральний закон дозволяє продаж цього виробу лише за призначенням або на замовлення лікарів та інших спеціалістів, які мають ліцензію на медичну практику від штату, у якому вони здійснюють свою практику, з метою використання або замовлення на використання цього виробу.

- Деякі компоненти реагентів, наданих Illumina для використання із секвенатором Секвенатор NovaSeq 6000Dx, містять потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може завдати шкоди здоров'ю. Надягайте захисне приладдя, зокрема засоби захисту очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосованих регіональних, державних і місцевих законів та нормативних правил. Для отримання інформації про захист довкілля, охорону праці та техніку безпеки, див. паспорти безпеки продукції (SDS) на вебсайті [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Недотримання викладених процедур може призвести до неправильних результатів або до значного погіршення якості зразка.
- Використовуйте стандартні заходи застереження, прийняті в лабораторії. Не виконуйте піпетування ротом. Не вживайте їжу або напої і не паліть у робочих зонах. Під час роботи зі зразками та реагентами з набору надягайте одноразові рукавички й лабораторний одяг. Після роботи зі зразками та реагентами з набору ретельно мийте руки.
- Належні правила поведінки й гігієни в лабораторії є обов'язковими для попередження забруднення реагентів, приладів та інструментів, а також геномних зразків ДНК продуктами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Забруднення продуктами ПЛР може призвести до неправильних і ненадійних результатів.
- Щоб попередити забруднення, виділіть для зон преампліфікації і постапліфікації спеціальне обладнання та витратні матеріали (як-от піпетки, наконечники піпеток, термостати, вихрові мішалки й центрифуги).

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- Прив'язка індексів до зразків вимагає точної відповідності схемі планшета з індексами. Застосунок DNA Prep with Enrichment автоматично заповнює дані про праймери для індексування, пов'язані з іменами зразків, якщо їх було введено під час налаштування прогону. Перед початком прогону секвенування рекомендовано перевіряти зв'язок індексних праймерів зі зразками. Невідповідність між зразком і результатами макету планшета завадить виявленню позитивного зразка та призведе до отримання хибного результату.
- Наполегливо рекомендовано встановити антивірусне програмне забезпечення, що замовляє користувач, для захисту комп'ютера від вірусів.
- Заборонено працювати на секвенаторі NovaSeq 6000Dx, коли з нього знято будь-яку з панелей. Експлуатація секвенатора, з якого знято хоча б одну з панелей, створює потенційну небезпеку від дії напруги електричної мережі й напруги постійного струму.
- Не торкайтеся платформи проточної кювети у відсіку проточної кювети. Нагрівач у цьому відсіку працює за температури від 22 °C до 95 °C, що може призвести до опіків.
- Цей секвенатор важить приблизно 480 кг і внаслідок падіння або неправильного поводження може призвести до тяжкого травмування.

## Технічні характеристики

Робочі характеристики секвенатора NovaSeq 6000Dx було встановлено з використанням аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для підготовки бібліотек, відповідних реагентів для секвенування (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) і Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)), а також застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для вторинного аналізу, зокрема для виявлення гермінальних і соматичних варіантів. Дослідження включали індексацію зразків, перенесення зразків, введення ДНК, аналітичну чутливість (межа холостої проби / межа виявлення), точність, прецизійність, порівняння методів і відтворюваність. Робочі характеристики, пов'язані з преаналітичними чинниками, як-от методи екстракції або інтерферувальні речовини, див. у документі *Інструкція з використання Illumina DNA Prep with Enrichment Dx*.

## Визначення обчислень, використаних у технічних характеристиках

1. Показник збігу позитивних результатів (ППА) обчислюється як кількісне відношення локусів, класифікованих як варіанти за еталонним методом, які правильно зареєстровано в процесі аналізу.
  - $(\text{Кількість локусів варіантів, правильно зареєстрованих у процесі аналізу}) / (\text{загальна кількість локусів варіантів})$Локуси варіантів, зареєстровані в процесі аналізу, що відповідають еталонному методу, є істинно-позитивними (ТР). Локуси варіантів, зареєстровані як еталонні розпізнавання або як інші розпізнавання варіантів у процесі аналізу, є хибнонегативними (ХН).

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

- Показник збігу негативних результатів (NPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, класифікованих як дикий тип за еталонним методом, які правильно зареєстровано в процесі аналізу.
  - $(\text{Кількість локусів дикої типу, правильно зареєстрованих в процесі аналізу}) / (\text{загальна кількість локусів дикої типу})$Локуси дикої типу, зареєстровані в процесі аналізу, що відповідають еталонному методу, є істинно-негативними (ІН). Локуси дикої типу, зареєстровані в процесі аналізу як варіанти, є хибнопозитивними (ХП).
- Відсоток загальної узгодженості (OPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, які правильно зареєстровано в процесі аналізу відносно еталонного методу.
  - $((\text{Кількість локусів варіантів, відображених аналізом}) + (\text{кількість локусів дикої типу, відображених аналізом})) / ((\text{загальна кількість локусів варіантів}) + (\text{загальна кількість локусів дикої типу}))$
- Обчислення параметрів PPA, NPA і OPA не включає нерозпізнання (варіантні або еталонні локуси, які не відповідають одному чи декільком фільтрам якості).
- Відсоток позитивних розпізнавань (PPC) — це кількість спостережень із виявленим варіантом, поділена на загальну кількість протестованих спостережень, за винятком будь-яких недійсних спостережень або тих, що були відфільтровані через низьку глибину.
- Відсоток негативних розпізнавань (PPC) розраховується як кількість спостережень, результатом яких є відповідність еталону в певній позиції, поділена на загальну кількість протестованих спостережень, за винятком будь-яких недійсних спостережень або тих, що були відфільтровані через низьку глибину.
- Відсоток здатності розпізнавати варіанти в автосомах розраховується як відсоток еталонних позицій, що не є N, у цільових ділянках на автосомних хромосомах із розпізнаним генотипом, що пройшов фільтр.

## Індексація зразків

Праймери індексу зразка, додані під час підготовки бібліотеки, присвоюють унікальну послідовність кожному зразку ДНК. Ці унікальні послідовності дають змогу об'єднувати декілька зразків у пул в одному прогоні секвенування. Індексація зразків використовується в робочому процесі як для генів зародкової лінії, так і для соматичних генів. Мета цього дослідження — установити мінімальну (12) і максимальну (192) кількість зразків, які можна обробити в одному прогоні секвенування на секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx. Дванадцять унікальних зразків ДНК Platinum Genome (NA12877–NA12888) було протестовано зі щонайменше 12 різними комбінаціями індексних праймерів на зразок. Бібліотеки зразків було підготовлено з використанням репрезентативного аналізу для пошуку низки генів, які покривають 1 970 505 основ для всіх 23 хромосом людини. Результати зразків із чотирьох прогонів секвенування з використанням робочого процесу аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx порівнювали з даними Platinum Genomes версії 2016-1.0.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

У першій серії прогонів 192 бібліотеки зразків з унікальними індексами секвенували у двох прогонах (по одному з використанням реагентів S2 та S4), щоб перевірити як максимальну підтримувану кількість індексів, так і здатність аналізу стабільно визначати генотип для конкретного зразка в різних комбінаціях праймерів для індексування. У другій серії прогонів 12 унікально індексованих бібліотек зразків було секвеновано у двох прогонах секвенування (по одному з використанням реагентів S2 та S4), щоб верифікувати мінімальну кількість підтримуваних індексів.

Для прогонів зі 192 індексами показник PPA для SNV становив від 99,7 % до 100 %, PPA для інсерцій — 100 %, PPA для делецій — від 96,7 % до 100 %, а NPA становив 100 %. Для прогонів із 12 індексами показник PPA для SNV становив від 99,7 % до 100 %, PPA для інсерцій знаходився в діапазоні від 89,6 % до 100 %, PPA для делецій — від 94,6 % до 100 %, а NPA становив 100 %.

## Перенесення зразків

Прилад Секвенатор NovaSeq 6000Dx дає змогу секвенувати кілька зразків разом із контролями в одному прогоні секвенування. Було проведено дослідження для оцінки ступеня перенесення зразків у межах одного прогону (within-run) і між прогонами секвенування (run-to-run). Дванадцять зразків ДНК Platinum Genome, шість чоловічих і шість жіночих, було досліджено з використанням репрезентативного аналізу, призначеного для оцінювання різних генів, що охоплюють 1 970 505 основ в усіх 23 хромосомах людини, включно з обома статевими хромосомами. Бібліотеки було секвеновано на приладі Секвенатор NovaSeq 6000Dx з використанням робочого процесу для генерації файлів FASTQ та VCF зародкової лінії лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Перенесення чоловічих зразків у жіночі спостерігалось за наявністю зчитувань цільових ділянок Y-хромосоми в жіночих зразках.

Перенесення зразків у межах одного прогону може виникати під час генерації кластерів, визначення основ в індексних циклах і демультіплексування зразків. Для дослідження перенесення зразків у межах одного прогону пул бібліотек, що складався щонайменше з дванадцяти повторів кожного унікального чоловічого та жіночого зразка плюс двох контролів без матриці, тобто загалом зі 192 унікально індексованих бібліотек, було секвеновано на приладі Секвенатор NovaSeq 6000Dx у двох прогонах секвенування, по одному з реагентами S2 і S4. Перенесення зразків у межах одного прогону оцінювали шляхом порівняння покриття цільових ділянок Y-хромосоми для кожного жіночого повтору із середнім покриттям цільових ділянок Y-хромосоми для всіх чоловічих повторів у пулі. 95-й процентиль спостережуваного перенесення в межах одного прогону становив 0,0090 % і 0,041 % для реагентів S2 і S4 відповідно.

Для дослідження перенесення зразків між прогонами було підготовлено два пули бібліотек і секвеновано їх послідовно на одному приладі Секвенатор NovaSeq 6000Dx, де на боці А використовували реагенти S4, а на боці В — реагенти S2. Перший пул містив щонайменше дванадцять повторів шести унікальних жіночих зразків плюс два контролі без матриці, тобто загалом 96 унікально індексованих бібліотек. Другий пул містив щонайменше дванадцять повторів шести унікальних чоловічих зразків плюс два контролі без матриці, тобто загалом 96 унікально індексованих бібліотек. В обох пулах використовували той самий набір індексних адаптерів. Спочатку секвенували жіночий пул, потім виконували наступний прогін секвенування з чоловічим пулом, а після цього — ще один повторний прогін секвенування жіночого пулу. Перенесення зразків між прогонами оцінювали окремо для кожного типу реагентів, S2 і

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

S4, шляхом порівняння покриття цільових ділянок Y-хромосоми між відповідними повторами повторного прогону жіночого пулу та прогону чоловічого пулу. 95-й перцентиль спостережуваного перенесення між прогонами становив 0,0089 % і 0,012 % для реагентів S2 і S4 відповідно.

## Введення ДНК

### Кров (зародкова лінія)

Діапазон вхідної ДНК зі зразків крові для набору Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з використанням застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx було встановлено для NovaSeq 6000Dx. Це було оцінено за допомогою дослідження серійного розведення з використанням восьми зразків ДНК Platinum Genome (NA12877 – NA12884); дослідження включало репрезентативний аналіз, призначений для пошуку низки генів, які покривають 1 970 505 основ для всіх 23 хромосом людини. Бібліотеки секвенували на одному секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx з використанням по одній партії наборів реагентів (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) і Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)).

Сім зразків було перевірено у двох повторностях на шести рівнях введення ДНК від 1000 нг до 10 нг (1000 нг, 250 нг, 100 нг, 50 нг, 25 нг і 10 нг). Восьмий зразок (NA12884) тестували в одній повторності для вхідної кількості 10 нг та у двох повторностях для всіх інших рівнів вхідної кількості. Для визначення точності зразки генотипів було порівняно зі зразками Platinum Genomes версії 2016-1.0. Результати були визначені для кожного рівня введення. Значення PPA для кожного типу варіантів (SNV, інсерції та делеції) представлено в таблиці [Результати PPA для кожного введення ДНК зі зразків крові за типом варіантів на стор. 35](#). Значення NPA представлено в таблиці [NPA для кожного введення ДНК зі зразків крові на стор. 36](#). Усі рівні введення мають подібну точність. Рекомендоване введення ДНК зі зразків крові для Illumina DNA Prep with Enrichment Dx становить 50–1000 нг за значень верхньої межі на рівні 1000 нг і нижньої межі на рівні 10 нг для відповідності технічним характеристикам у разі секвенування на приладі NovaSeq 6000Dx.

Таблиця 9. Результати PPA для кожного введення ДНК зі зразків крові за типом варіантів

Введення ДНК (нг)	Тип варіанта	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	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	

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Введення ДНК (нг)	Тип варіанта	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	PPA (%)
10	Інсерція	2732	2732	0	0	100
25		2928	2916	6	6	99,8
50			2914	8	6	99,7
100			2917	6	5	99,8
250			2928	0	0	100
1000			2921	5	2	99,8
10	Делеція	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

Таблиця 10. NPA для кожного введення ДНК зі зразків крові

Введення ДНК (нг)	ІН	ХП	Референсні нерозпізнавання	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

## Зразки FFPE (Соматичні варіанти)

Діапазон вхідної ДНК з фіксованих формаліном і залитих парафіном (FFPE) тканин для набору Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з використанням застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx було встановлено для системи NovaSeq 6000Dx. Це було оцінено за допомогою дослідження серійного розведення з використанням восьми зразків Platinum Genome; дослідження включало репрезентативний аналіз, призначений для пошуку низки генів, які покривають 1 970 505 основ для всіх 23 хромосом людини. Бібліотеки секвенували на одному секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx з використанням по одній партії наборів реагентів (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) і Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)).

Зразок ДНК лінії GM12877 було розведено зразком ДНК лінії GM12878 для отримання лінії GM12877-13 з унікальними гетерозиготними та гомозиготними варіантами GM12877 із частотою приблизно 6,5 % і 13 % відповідно. Також тестували нерозбавлену лінію GM12877. GM12877-13 тестували у двох повторностях на чотирьох рівнях введення ДНК від 1000 нг до 25 нг (1000 нг, 250 нг, 50 нг і 25 нг). GM12877 тестували в

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

одній повторності для 250 нг та у двох повторностях для всіх інших рівнів вхідної кількості. Для визначення точності отримані показники розпізнавання варіантів зразків було порівняно зі зразками Platinum Genomes версії 2016-1.0. Результати були визначені для кожного рівня введення. Значення PPA для кожного типу варіантів (SNV, інсерції та делеції) представлено в таблиці [Результати PPA для кожного введення ДНК зі зразків FFPE за типом варіантів і цільовою VAF на стор. 37](#). Значення NPA представлено в таблиці [NPA для кожного введення ДНК зі зразків FFPE на стор. 37](#). Усі рівні введення мають подібну точність. Для зразків FFPE зі значенням  $\Delta Cq \leq 5$  рекомендована вхідна кількість ДНК становить 50–1000 нг для набору Illumina DNA Prep with Enrichment Dx за значень верхньої межі на рівні 1000 нг і нижньої межі на рівні 25 нг для відповідності технічним характеристикам у разі секвенування на приладі NovaSeq 6000Dx.

Таблиця 11. Результати PPA для кожного введення ДНК зі зразків FFPE за типом варіантів і цільовою VAF

Цільова VAF розведення											
0,065											
0,13											
Введення ДНК (нг)	Тип варіанта	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	PPA (%)	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	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	Інсерція	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	Делеція	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

Таблиця 12. NPA для кожного введення ДНК зі зразків FFPE

Введення ДНК (нг)	Прогнозований дикий тип	ІН	ХП	Референсні нерозпізнавання	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

## Аналітична чутливість (межа холостої проби (LoB) і межа виявлення (LoD))

Це дослідження було проведено для оцінювання межі холостої проби (LoB) і межі виявлення (LoD) для робочої процедури аналізу з генеруванням файлів Somatic FASTQ та VCF у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx на секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx. У дослідженні було застосовано репрезентативний аналіз для пошуку низки генів, які покривають 1 970 505 основ для всіх 23 хромосом людини. Клітинні лінії Platinum Genome GM12878 і GM12877 фіксувались у формаліні та заливалися парафіном, після чого було проведено екстракцію ДНК. Розведення GM12877 у GM12878 готували для створення зразків, що склалися з 0 %, 4 %, 6,5 % та 13 % GM12877 за об'ємом, таким чином, щоб частоти варіантів 489 унікальних варіантів GM12877 (454 SNV, 17 інсерцій та 18 делецій) становили від 0 до 0,13. Бібліотеки зразків готували з використанням двох серій реагентів набору Illumina DNA Prep with Enrichment Dx та секвенували протягом шести послідовних днів прогону на двох секвенаторах Секвенатор NovaSeq 6000Dx із використанням по дві партії кожного з наборів реагентів (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) і Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)), що загалом склало дванадцять прогонів секвенування. Це забезпечило 288 спостережень для кожного варіанта в кожному розведенні зразка. LoB і LoD було обчислено за допомогою класичного підходу, описаного в стандарті CLSI EP17-A2. LoB та LoD розраховували для реагентів S2 та S4 окремо шляхом об'єднання частот усіх варіантів у прогоні секвенування для кожного типу реагентів. Помилку першого роду було встановлено на рівні 0,01, помилку другого роду — на рівні 0,05.

Значення LoB оцінювали для 489 локусів незалежно у двох серіях секвенування для кожного типу реагентів (S2 або S4) та підготовки бібліотек. Для реагентів S2 95-й перцентиль LoB становив 2,9 %. Для реагентів S4 95-й перцентиль LoB становив 2,2 %.

Значення LoD було успішно розраховано для 478 із 489 варіантів для S2 та 485 із 489 варіантів для S4. Варіанти, для яких не було визначено LoD для однієї або обох підготовок бібліотек, були виключені з остаточного призначення LoD для NovaSeq 6000Dx. LoD системи NovaSeq 6000Dx із реагентами S2 та S4 визначали шляхом розрахунку 95-го перцентилу значень LoD окремих варіантів. Для реагентів S2 95-й перцентиль серед значень LoD 478 варіантів становив 4,8 %. Для реагентів S4 95-й перцентиль серед значень LoD 485 варіантів становив 3,9 %.

# Точність

## Гермінальні варіанти

Описане далі дослідження було проведено для оцінки точності виявлення варіантів у робочому процесі аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx на секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx із використанням реагентів, що входять у Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів). Чотири унікальні зразки ДНК Platinum Genome було протестовано з використанням репрезентативного аналізу, розробленого для дослідження різних генів, що покривають 1 970 505 основ (9 232 цілі) у всіх 23 хромосомах людини. Кожен із цих зразків було протестовано у 12 повторностях, за винятком NA12880, який було протестовано в 11 повторностях. Загалом було виконано 18 прогонів із використанням трьох секвенаторів і трьох серій реагентів S2 та за участі двох операторів протягом шести днів прогону. Точність для SNV, інсерцій та делецій було визначено шляхом порівняння результатів зі зразками Platinum Genome версії 2016-1.0.

Таблиця 13. Зведені дані узгодженості для варіантів зародкової лінії

Критерії	Загальні спостереження <sup>1</sup>	Результат спостереження <sup>2</sup>	Результат за запуском <sup>3</sup>
PPA для SNV	846	99,8	99,9
PPA для інсерцій	846	97,9	> 99,9
PPA для делецій	846	96,9	99,9
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Обчислено як кількість зразків на прогін (47) × кількість прогонів (18) = 846.

<sup>2</sup>Найменше отримане значення за повторністю зразка в усіх 18 прогонах.

<sup>3</sup>Найменше значення, коли дані з кожного прогону аналізуються сукупно.

*Узгодженість варіантів зародкової лінії за зразками на стор. 40* містить дані дослідження з відсотками збігу позитивних і негативних результатів залежно від зразка, де результати для варіантів порівняно з даними зразків Platinum Genome версії 2016-1.0 для обчислення PPA. Поєднано три типи варіантів (SNV, інсерцій та делецій). Еталонний метод дає результати лише для однуклеотидних варіантів та інсерцій/делецій, тому для обчислення NPA результати розпізнавання основ, які не належать до варіантів, порівнюються зі збіркою еталонної послідовності генома людини hg19.

Таблиця 14. Узгодженість варіантів зародкової лінії за зразками

Зразок	Здатність розпізнавати варіанти в автосомах	Прогнозовані варіанти <sup>1</sup>	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	ІН	ХП	РРА	NPA	ORA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	> 99,9	> 99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	> 99,9	> 99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	> 99,9	> 99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup> Загальна кількість варіантів у всіх повторностях зразків для 18 прогонів.

Таблиця [Узгодженість варіантів зародкової лінії для зразків за типом варіанта на стор. 40](#) містить дані дослідження, представлені залежно від зразка, де результати варіантів порівняно з показниками, установленими за допомогою точно охарактеризованого складеного еталонного методу. Виявлення оцінюється для кожного типу варіанта — SNV, інсерції й делеції окремо. Референсні позиції виключено.

Таблиця 15. Узгодженість варіантів зародкової лінії для зразків за типом варіанта

Зразок	SVN			Інсерції			Делеції		
	Прогнозовано	ІП	ХН	Прогнозовано	ІП	ХН	Прогнозовано	ІП	ХН
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

Зразки було додатково проаналізовано для розпізнавання незначних інсерцій і делецій (інделів). Загальні зведені дані наведено в таблиці [Зведені дані виявлення інделів для зародкової лінії на стор. 40](#). Загалом було виявлено 210 інделів розміром 1–18 п. о. для інсерцій і 1–21 п. о. для делецій.

Таблиця 16. Зведені дані виявлення інделів для зародкової лінії

Тип варіанта	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	РРА
Інсерція	36954	36953	1	0	> 99,9

Тип варіанта	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	PPA
Делеція	29358	28986	16	356	99,9

Репрезентативний аналіз складався з 9 232 цілей, які охоплювали різноманітний геномний матеріал. Уміст GC в цілях варіювався в межах 0,20–0,86. Також цільові ділянки мали низку одонуклеотидних (наприклад, полі-А, полі-Т), динуклеотидних і тринуклеотидних повторів. Дані, зібрані залежно від хромосоми для визначення впливу геномного вмісту на відсоток правильних розпізнавань, представлені в таблиці [Точність на рівні хромосом для зародкової лінії на стор. 41](#). Відсоток правильних розпізнавань складається з варіантних і референсних розпізнавань, він менше 100 %, якщо наявні неправильні розпізнавання або нерозпізнавання.

Таблиця 17. Точність на рівні хромосом для зародкової лінії

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr1	47	728	138328	Полі-А (12), полі-С (7), полі-Т (14), полі-G (7), динуклеотид (22), тринуклеотид (8), інсерція (18), делеція (4)	[0,22–0,8]; медіана: 0,51	114888718	34	966860	> 99,9	0,83

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr2	39	628	159588	Полі-А (46), полі-С (8), полі-Т (23), полі-Г (7), динуклеотид (22), тринуклеотид (8), інсерція (5), делеція (2)	[0,24–0,81]; медіана: 0,44	132293464	798	460345	> 99,9	0,35
chr3	38	650	137627	Полі-А (18), полі-С (6), полі-Т (18), полі-Г (7), динуклеотид (12), тринуклеотид (6), інсерція (11), делеція (1)	[0,25–0,86]; медіана: 0,45	114625053	2	226461	> 99,9	0,20

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr4	17	370	73766	Полі-А (9), полі-С (7), полі-Т (25), полі-Г (6), динуклеотид (5), тринуклеотид (5), інсерція (2), делеція (2)	[0,27–0,77]; медіана: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	Полі-А (10), полі-С (6), полі-Т (12), полі-Г (7), динуклеотид (10), тринуклеотид (8), інсерція (8), делеція (18)	[0,29–0,79]; медіана: 0,46	75314497	912	153061	> 99,9	0,20

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr6	39	453	126721	Полі-А (28), полі-С (7), полі-Т (33), полі-Г (7), динуклеотид (18), тринуклеотид (11), інсерція (4), делеція (2)	[0,24–0,79]; медіана: 0,48	103412695	1	182361	> 99,9	0,18
chr7	21	450	161501	Полі-А (27), полі-С (8), полі-Т (21), полі-Г (7), динуклеотид (31), тринуклеотид (5), інсерція (1), делеція (4)	[0,2–0,77]; медіана: 0,46	132534074	19	246884	> 99,9	0,19

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr8	18	381	67775	Полі-А (19), полі-С (7), полі-Т (13), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (9), інсерція (4), делеція (1)	[0,26–0,78]; медіана: 0,47	56247612	411	170925	> 99,9	0,30
chr9	23	347	87100	Полі-А (12), полі-С (7), полі-Т (27), полі-Г (8), динуклеотид (9), тринуклеотид (9), інсерція (4), делеція (1)	[0,27–0,83]; медіана: 0,49	72650800	20	241991	> 99,9	0,33
chr10	14	317	66723	Полі-А (26), полі-С (7), полі-Т (15), полі-Г (6), динуклеотид (16), тринуклеотид (6), інсерція (1), делеція (1)	[0,23–0,78]; медіана: 0,44	55539058	1	188216	> 99,9	0,34

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr11	29	511	91786	Полі-А (28), полі-С (8), полі-Т (21), полі-Г (7), динуклеотид (26), тринуклеотид (7), інсерція (2), делеція (2)	[0,28–0,8]; медіана: 0,47	75744222	742	259258	> 99,9	0,34
chr12	29	577	120365	Полі-А (19), полі-С (8), полі-Т (40), полі-Г (7), динуклеотид (7), тринуклеотид (7), інсерція (1), делеція (5)	[0,26–0,77]; медіана: 0,49	99972530	1	542005	> 99,9	0,54

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr13	13	283	58639	Полі-А (24), полі-С (6), полі-Т (12), полі-Г (7), динуклеотид (6), тринуклеотид (8), інсерція (14), делеція (0)	[0,28–0,79]; медіана: 0,42	48503179	1	45666	> 99,9	0,09
chr14	11	147	26980	Полі-А (21), полі-С (6), полі-Т (18), полі-Г (11), динуклеотид (6), тринуклеотид (6), інсерція (4), делеція (1)	[0,29–0,77]; медіана: 0,47	22286153	198	147895	> 99,9	0,66
chr15	15	266	52091	Полі-А (26), полі-С (7), полі-Т (13), полі-Г (6), тринуклеотид (8), інсерція (4), делеція (6)	[0,29–0,76]; медіана: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr16	21	366	80030	Полі-А (7), полі-С (7), полі-Т (15), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (10), інсерція (15), делеція (21)	[0,3–0,76]; медіана: 0,54	65490245	16	1438278	> 99,9	2,15
chr17	36	645	118062	Полі-А (19), полі-С (7), полі-Т (18), полі-Г (8), динуклеотид (13), тринуклеотид (6), інсерція (18), делеція (16)	[0,28–0,82]; медіана: 0,49	97929929	417	335905	> 99,9	0,34

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr18	9	99	19195	Полі-А (7), полі-С (7), полі-Т (15), полі-Г (6), тринуклеотид (10), інсерція (4), делеція (0)	[0,22–0,78]; медіана: 0,44	15967171	312	42077	> 99,9	0,26
chr19	30	605	104004	Полі-А (19), полі-С (7), полі-Т (31), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (7), інсерція (2), делеція (21)	[0,33–0,83]; медіана: 0,59	85642066	3	678213	> 99,9	0,79
chr20	12	179	33795	Полі-А (6), полі-С (6), полі-Т (7), полі-Г (8), тринуклеотид (9), інсерція (5), делеція (0)	[0,31–0,84]; медіана: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr21	5	63	30642	Полі-А (28), полі-С (6), полі-Т (24), полі-Г (7), динуклеотид (5), інсерція (2), делеція (5)	[0,22–0,78]; медіана: 0,52	25319736	50	57434	> 99,9	0,23
chr22	10	187	36727	Полі-А (26), полі-С (7), полі-Т (19), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (6), інсерція (6), делеція (0)	[0,27–0,74]; медіана: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chrX	23	433	83576	Полі-А (18), полі-С (8), полі-Т (23), полі-Г (9), динуклеотид (5), тринуклеотид (23), інсерція (3), делеція (0)	[0,2–0,72]; медіана: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Полі-А (11), полі-С (8), полі-Т (11), полі-Г (5), інсерція (0), делеція (0)	[0,4–0,59]; медіана: 0,45	0	0	0	Н/Д	Н/Д

Результати секвенування для зразка лінії NA12878 було порівняно з генотипом із високим ступенем вірогідності для NA12878, затвердженим Національним інститутом стандартів і технології (NIST) (версія 2.19). 8009 із 9232 цілей було виявлено повністю в межах геномних ділянок із високим ступенем вірогідності, 776 цілей мали часткове перекриття, а 447 цілей не мали перекриття в послідовності, затвердженій NIST. Це призвело до появи 1 831 483 координат на повторність для порівняння. Результати розпізнавання основ, які не належали до варіантів, було порівняно зі збіркою еталонної послідовності генома людини hg19. Результати дослідження точності наведено в таблиці [Узгодженість зразків лінії NA12878 із базою даних NIST для зародкової лінії на стор. 51](#).

Таблиця 18. Узгодженість зразків лінії NA12878 із базою даних NIST для зародкової лінії

Зразок	Кількість охоплених цілей	Здатність розпізнавати варіанти в автосомах	ІП	ХН	ІН	ХП	РРА	НРА	ОРА
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	> 99,9	> 99,9	> 99,9

На підставі даних, отриманих у цьому дослідженні матеріалу зародкової лінії протягом 18 прогонів, прилад Секвенатор NovaSeq 6000Dx може секвенувати з отриманням стабільних результатів наведені далі послідовності.

- Зі вмістом GC  $\geq 20$  % (усі основи, що розпізнавались у 1692 секвенованих цільових ділянках зі вмістом GC 20 %, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0 %)
- Зі вмістом GC  $\geq 86$  % (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках зі вмістом GC 86 %, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0 %)
- Фрагменти полі-А довжиною  $\leq 46$  (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках із 46 повторами полі-А, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0,27 %)
- Фрагменти полі-Т довжиною  $\leq 40$  (13384074 з 13384321 основ, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках із 40 повторами полі-Т, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0,26 %)
- Фрагменти полі-Г довжиною  $\leq 11$  (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках з 11 повторами полі-Г, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0 %)
- Фрагменти полі-С довжиною  $\leq 8$  (9815030 із 9815035 основ, що розпізнавались у 5922 секвенованих цільових ділянках із 8 повторами полі-С, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0,53 %)
- Довжини динуклеотидних повторів  $\leq 31x$  (32233922 з 32233926 розпізнаних основ у 846 секвенованих цільових ділянках із 31 динуклеотидним повтором були розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0,21 %)
- Довжини тринуклеотидних повторів  $\leq 23x$  (усі розпізнані основи у 846 секвенованих цільових ділянках із 23 тринуклеотидними повторами були розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0,21 %)
- Інсерції довжиною  $\leq 18$  (усі основи, що розпізнавались у 1692 секвенованих цільових ділянках із 18 інсерціями, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 7,71 %)
- Делеції довжиною  $\leq 21$  (усі основи, що розпізнавались у 1692 секвенованих цільових ділянках із 21 делецією, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 1,14 %)

## Соматичні варіанти

Описане тут дослідження було використане для оцінки точності виявлення варіантів у робочому процесі аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF соматичних варіантів у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx на секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx із використанням реагентів, що входять у Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів).

У цьому дослідженні застосовано репрезентативний аналіз для пошуку низки генів, які покривають 1 970 505 основ (9 232 цілі) для всіх 23 хромосом. ДНК для зразків Platinum Genome було екстраговано з блоків, оброблених за методом FFPE, з метою отримання чотирьох унікальних зразків із подальшим оцінюванням у дослідженні.

Зразок ДНК лінії GM12877 було розведено зразком ДНК лінії GM12878 для отримання лінії GM12877-13 з унікальними гетерозиготними та гомозиготними варіантами GM12877 із частотою приблизно 6,5 % і 13 % відповідно. Зразок ДНК лінії GM12878 було аналогічно розведено зразком ДНК лінії GM12877 для отримання лінії GM12878-13 з унікальними гетерозиготними та гомозиготними варіантами GM12878 із частотою приблизно 6,5 % і 13 % відповідно. Також тестували нерозбавлені лінії GM12877 та GM12878. Кожен із цих зразків було протестовано у 12 повторностях, за винятком GM12878, який було протестовано в одинадцяти повторностях. Загалом було виконано вісімнадцять прогонів із використанням трьох секвенаторів і трьох серій реагентів S4 за участю двох операторів протягом шести днів прогону. Точність для SNV, інсерцій та делецій було визначено шляхом порівняння результатів зі зразками Platinum Genome версії 2016-1.0.

Таблиця 19. Зведені дані узгодженості для соматичних варіантів

Критерії	Кількість спостережень <sup>1</sup>	Результат спостережень <sup>2</sup>	Результат за прогоном <sup>3</sup>
PPA для соматичних SNV	846	99,8	98,9
PPA для соматичних інсерцій	846	100	100
PPA для соматичних делецій	846	100	100
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup> Розраховується як = кількість зразків на прогін (47) x кількість прогонів (18) = 846.

<sup>2</sup> Найменше отримане значення за повторністю зразка в усіх 18 прогонах.

<sup>3</sup> Найменше значення, коли дані з кожного прогону аналізуються сукупно.

Таблиця [Узгодженість соматичних варіантів за зразками на стор. 54](#) містить дані дослідження, представлені з відсотками збігу позитивних і негативних результатів залежно від зразка, де результати варіантів порівняно з точно охарактеризованим складеним еталонним методом для обчислення PPA. Поєднано три типи варіантів (SNV, інсерції та делеції). Еталонний метод дає результати лише для одонуклеотидних варіантів та інсерцій/делецій, тому для обчислення NPA результати розпізнавання основ, які не належать до варіантів, порівнюються зі збіркою еталонної послідовності генома людини hg19.

Таблиця 20. Узгодженість соматичних варіантів за зразками

Зразок	Здатність розпізнавати варіанти в автосомах	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	ІН	ХП	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	> 99,9	> 99,9

Таблиця [Узгодженість соматичних варіантів для зразків за типом варіанта на стор. 54](#) містить дані дослідження, представлені залежно від зразка, де результати варіантів порівняно з показниками, установленими за допомогою точно охарактеризованого складеного еталонного методу. Виявлення оцінюється для кожного типу варіанта — SNV, інсерції й делеції окремо. Референсні позиції виключено.

Таблиця 21. Узгодженість соматичних варіантів для зразків за типом варіанта

Зразок	SNV			Інсерції			Делеції		
	Прогнозовано	ІП	ХН	Прогнозовано	ІП	ХН	Прогнозовано	ІП	ХН
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

Чотири зразки було додатково проаналізовано для розпізнавання незначних інсерцій і делецій (інделів). Загальні зведені дані наведено в таблиці [Зведені дані виявлення інделів для соматичного варіанта на стор. 55](#). Загалом було виявлено 210 інделів розміром 1–18 п. о. для інсерцій і 1–21 п. о. для делецій.

Таблиця 22. Зведені дані виявлення інделів для соматичного варіанта

Тип варіанта	Прогнозовані варіанти	ІП	ХН	Варіанти без розпізнавань	PPA
Інсерція	11772	11772	0	0	100
Делеція	10098	9666	0	432	100

Репрезентативний аналіз складався з 9 232 цілей, які охоплювали різноманітний геномний матеріал. Уміст GC в цілях варіювався в межах 0,20–0,86. Також цільові ділянки мали низку одонуклеотидних (наприклад, полі-А, полі-Т), динуклеотидних і тринуклеотидних повторів. Дані, зібрані залежно від хромосоми для визначення впливу геномного вмісту на відсоток правильних розпізнавань, представлені в таблиці [Точність на рівні хромосом для соматичних варіантів на стор. 55](#). Відсоток правильних розпізнавань складається з варіантних і референсних розпізнавань, він менше 100 %, якщо наявні неправильні розпізнавання або нерозпізнавання.

Таблиця 23. Точність на рівні хромосом для соматичних варіантів

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr1	47	728	138328	Полі-А (12), полі-С (7), полі-Т (14), полі-G (7), динуклеотид (22), тринуклеотид (8), інсерція (3), делеція (0)	[0,22–0,8]; медіана: 0,51	110145939	52	5642613	> 99,9	4,9

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr2	39	628	159588	Полі-А (46), полі-С (8), полі-Т (23), полі-Г (7), динуклеотид (22), тринуклеотид (8), інсерція (5), делеція (1)	[0,24–0,81]; медіана: 0,44	126795713	842	5850393	> 99,9	4,4
chr3	38	650	137627	Полі-А (18), полі-С (6), полі-Т (18), полі-Г (7), динуклеотид (12), тринуклеотид (6), інсерція (1), делеція (1)	[0,25–0,86]; медіана: 0,45	109902527	593	4889226	> 99,9	4,3
chr4	17	370	73766	Полі-А (9), полі-С (7), полі-Т (25), полі-Г (6), динуклеотид (5), тринуклеотид (5), інсерція (0), делеція (1)	[0,27–0,77]; медіана: 0,45	59373461	16	2517412	> 99,9	4,1

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr5	25	507	90008	Полі-А (10), полі-С (6), полі-Т (12), полі-Г (7), динуклеотид (10), тринуклеотид (8), інсерція (8), делеція (18)	[0,29–0,79]; медіана: 0,46	72261191	723	3116981	> 99,9	4,1
chr6	39	453	126721	Полі-А (28), полі-С (7), полі-Т (33), полі-Г (7), динуклеотид (18), тринуклеотид (11), інсерція (0), делеція (1)	[0,24–0,79]; медіана: 0,48	98593101	687	4890221	> 99,9	4,7

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr7	21	450	161501	Полі-А (27), полі-С (8), полі-Т (21), полі-Г (7), динуклеотид (31), тринуклеотид (5), інсерція (1), делеція (4)	[0,2–0,77]; медіана: 0,46	126913574	104	5773856	> 99,9	4,4
chr8	18	381	67775	Полі-А (19), полі-С (7), полі-Т (13), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (9), інсерція (4), делеція (0)	[0,26–0,78]; медіана: 0,47	53430489	175	2958909	> 99,9	5,2

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr9	23	347	87100	Полі-А (12), полі-С (7), полі-Т (27), полі-Г (8), динуклеотид (9), тринуклеотид (9), інсерція (0), делеція (1)	[0,27–0,83]; медіана: 0,49	69594586	74	3260257	> 99,9	4,5
chr10	14	317	66723	Полі-А (26), полі-С (7), полі-Т (15), полі-Г (6), динуклеотид (16), тринуклеотид (6), інсерція (0), делеція (0)	[0,23–0,78]; медіана: 0,44	53209592	90	2469444	> 99,9	4,4

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr11	29	511	91786	Полі-А (28), полі-С (8), полі-Т (21), полі-Г (7), динуклеотид (26), тринуклеотид (7), інсерція (2), делеція (2)	[0,28–0,8]; медіана: 0,47	72291795	150	3665560	> 99,9	4,8
chr12	29	577	120365	Полі-А (19), полі-С (8), полі-Т (40), полі-Г (7), динуклеотид (7), тринуклеотид (7), інсерція (0), делеція (3)	[0,26–0,77]; медіана: 0,49	96109352	101	4331932	> 99,9	4,3

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr13	13	283	58639	Полі-А (24), полі-С (6), полі-Т (12), полі-Г (7), динуклеотид (6), тринуклеотид (8), інсерція (14), делеція (0)	[0,28–0,79]; медіана: 0,42	46130028	44	2384839	> 99,9	4,9
chr14	11	147	26980	Полі-А (21), полі-С (6), полі-Т (18), полі-Г (11), динуклеотид (6), тринуклеотид (6), інсерція (4), делеція (0)	[0,29–0,77]; медіана: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr15	15	266	52091	Полі-А (26), полі-С (7), полі-Т (13), полі-Г (6), тринуклеотид (8), інсерція (4), делеція (0)	[0,29–0,76]; медіана: 0,46	41918631	184	1753300	> 99,9	4,0
chr16	21	366	80030	Полі-А (7), полі-С (7), полі-Т (15), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (10), інсерція (15), делеція (21)	[0,3–0,76]; медіана: 0,54	62344351	18	4540539	> 99,9	6,8

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr17	36	645	118062	Полі-А (19), полі-С (7), полі-Т (18), полі-Г (8), динуклеотид (13), тринуклеотид (6), інсерція (18), делеція (1)	[0,28–0,82]; медіана: 0,49	93811318	414	4403622	> 99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Полі-А (7), полі-С (7), полі-Т (15), полі-Г (6), тринуклеотид (10), інсерція (0), делеція (0)	[0,22–0,78]; медіана: 0,44	15007653	6	990633	> 99,9	6,2

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr19	30	605	104004	Полі-А (19), полі-С (7), полі-Т (31), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (7), інсерція (2), делеція (3)	[0,33–0,83]; медіана: 0,59	81416722	455	4860311	> 99,9	5,6
chr20	12	179	33795	Полі-А (6), полі-С (6), полі-Т (7), полі-Г (8), тринуклеотид (9), інсерція (5), делеція (0)	[0,31–0,84]; медіана: 0,53	26833936	7	1301905	> 99,9	4,6
chr21	5	63	30642	Полі-А (28), полі-С (6), полі-Т (24), полі-Г (7), динуклеотид (5), інсерція (1), делеція (0)	[0,22–0,78]; медіана: 0,52	24169250	44	1172087	> 99,9	4,6

Хромосома	Кількість генів	Кількість цілей	Кількість основ	Геномний вміст	Діапазон GC	Правильні розпізнавання	Неправильні розпізнавання	Нерозпізнавання	% правильних розпізнавань	% нерозпізнавань
chr22	10	187	36727	Полі-А (26), полі-С (7), полі-Т (19), полі-Г (7), динуклеотид (5), тринуклеотид (6), інсерція (6), делеція (0)	[0,27–0,74]; медіана: 0,51	28887217	86	1392179	> 99,9	4,6
chrX	23	433	83576	Полі-А (18), полі-С (8), полі-Т (23), полі-Г (9), динуклеотид (5), тринуклеотид (23), інсерція (3), делеція (0)	[0,2–0,72]; медіана: 0,48	64231080	241	3852253	> 99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Полі-А(11), полі-С (8), полі-Т (11), полі-Г (5), інсерція (0), делеція (0)	[0,4–0,59]; медіана: 0,45	0	0	0	Н/Д	Н/Д

Результати секвенування для зразків лінії GM12878 було порівняно з генотипом із високим ступенем вірогідності для лінії NA12878, затвердженим Національним інститутом стандартів і технології (NIST) (версія 2.19). 8009 із 9232 цілей було виявлено повністю в межах геномних ділянок із високим ступенем вірогідності, 776 цілей мали часткове перекриття, а 447 цілей не мали перекриття в послідовності, затвердженій NIST. Це призвело до появи 1 831 483 координат на повторність для порівняння. Результати розпізнавання основ, які не належали до варіантів, було порівняно зі збіркою еталонної послідовності генома людини hg19. Результати дослідження точності наведено в таблиці [Узгодженість зразків лінії GM12878 із базою даних NIST для соматичних варіантів на стор. 66](#).

Таблиця 24. Узгодженість зразків лінії GM12878 із базою даних NIST для соматичних варіантів

Зразок	Кількість охоплених цілей	Здатність розпізнавати варіанти в автосомах	ІП	ХН	ІН	ХП	РРА	НРА	ОРА
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	> 99,9	> 99,9

На підставі даних, отриманих у цьому дослідженні соматичного матеріалу протягом 18 прогонів, прилад Секвенатор NovaSeq 6000DX може секвенувати з отриманням стабільних результатів наведені далі послідовності:

- Зі вмістом GC  $\geq 20$  % (усі основи, що розпізнавались у 1692 секвенованих цільових ділянках зі вмістом GC 20 %, розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,34 %)
- Зі вмістом GC  $\geq 86$  % (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках зі вмістом GC 86 %, розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 4,21 %)
- Фрагменти полі-А довжиною  $\leq 46$  (14550082 з 14550083 основ, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках із 46 повторами полі-А, розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 4,18 %)
- Фрагменти полі-Т довжиною  $\leq 40$  (12833489 із 12833491 основ, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках із 40 повторами полі-Т, розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 4,37 %)
- Фрагменти полі-Г довжиною  $\leq 11$  (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках з 11 повторами полі-Г, розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 7,59 %)
- Фрагменти полі-С довжиною  $\leq 8$  (9405604 з 9405615 основ, що розпізнавались у 5922 секвенованих цільових ділянках із 8 повторами полі-С, розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 4,68 %)
- Довжини динуклеотидних повторів  $\leq 31x$  (30996684 з 30996712 розпізнаних основ у 846 секвенованих цільових ділянках із 31 динуклеотидним повтором були розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 4,04 %)
- Довжини тринуклеотидних повторів  $\leq 23x$  (усі розпізнані основи у 846 секвенованих цільових ділянках із 23 тринуклеотидними повторами були розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 5,39 %)

- Інсерції довжиною  $\leq 18$  (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках із 18 інсерціями, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 1,44 %)
- Делеції довжиною  $\leq 21$  (усі основи, що розпізнавались у 846 секвенованих цільових ділянках із 21 делецією, розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 7,86 %)

## Прецизійність

Прецизійність секвенатора Секвенатор NovaSeq 6000Dx оцінювали із застосуванням зразків Platinum Genome та репрезентативного аналізу, розробленого для дослідження різних генів, що охоплюють 1 970 505 основ у 23 різних хромосомах із використанням 9232 цільових олігонуклеотидів. Загалом було оцінено 1723 цільові малі варіанти (SNV, вставки та делеції). Тестування гермінальних варіантів складалося з одинадцяти або дванадцяти повторів чотирьох унікальних зразків Platinum Genome. Тестування соматичних варіантів складалося з одинадцяти або дванадцяти повторів чотирьох унікальних зразків Platinum Genome, оброблених як FFPE, на різних рівнях VAF. Бібліотеки зразків готували з використанням реагентів, що входять у Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Тестування проводили в одному внутрішньому центрі з використанням трьох секвенаторів Секвенатор NovaSeq 6000Dx, трьох партій реагентів кожного з наборів (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) і Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)), а також за участю двох операторів протягом шести днів запуску. У кожний день запуску бібліотеки гермінальних зразків секвенували на одному боці секвенатора з використанням реагентів S2 та робочого процесу аналізу генерації файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, а бібліотеки соматичних зразків секвенували на іншому боці секвенатора з використанням реагентів S4 та робочого процесу аналізу генерації файлів FASTQ та VCF соматичних варіантів у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. У результаті цього тестування було отримано 18 проточних кювет для кожного гермінального та соматичного робочих процесів.

## Гермінальні варіанти

Для гермінальних прогонів геномні позиції, у яких виявлено цільовий гермінальний варіант, повідомляються як позитивні (варіант). Для очікуваних позитивних гермінальних варіантів дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком позитивних визначень (PPC) у межах кожного типу варіанта (SNV, вставка, делеція). Таблиця [Внутрішньолабораторна прецизійність спостережень за розпізнаванням зародкової лінії для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта на стор. 68](#) узагальнює спостережені показники разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), обчисленими за методом оцінки Вілсона, для кожного типу варіанта.

Таблиця 25. Внутрішньолабораторна прецизійність спостережень за розпізнаванням зародкової лінії для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережені позитивні визначення <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPB
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Інсерція	0	36738	0	36738	36738	100	> 99,99	100
Делеція	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Позитивним визначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

Геномні позиції, у яких цільового варіанта не виявлено, повідомляються як негативні (дикий тип). Для очікуваних негативних позицій дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком негативних визначень (PNC). Таблиця [Внутрішньолабораторна прецизійність спостережень за розпізнаванням зародкової лінії для очікуваних негативних результатів на стор. 69](#) узагальнює спостережені показники разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), обчисленими за методом оцінки Вілсона.

Таблиця 26. Внутрішньолабораторна прецизійність спостережень за розпізнаванням зародкової лінії для очікуваних негативних результатів

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережувані негативні розпізнавання <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPB
Дикий тип	0	406170	0	406170	406170	100	> 99,99	100

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Негативне розпізнавання визначається як цільові хромосомні позиції, у яких не виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

Внесок кожного параметра (секвенатор, серія реагентів, день, повторність бібліотеки) у загальну варіабельність визначали за допомогою аналізу компонентів дисперсії, де частота варіантів була залежною змінною (відгуком). Середнє значення загального стандартного відхилення становило 0,0370. Найбільший внесок у варіабельність частоти варіантів припадав на повторності підготовки бібліотек, що становило 17,1 % від загальної варіабельності. Внесок чинника «день» становив 1 %, тоді як внесок секвенатора та серії реагентів у загальну варіабельність становив менше ніж 1 % для кожного з них. Див. таблицю [Оцінка компонентів дисперсії внутрішньолабораторної прецизійності для частот варіантів у зразках зародкової лінії на стор. 69](#) (СВ = стандартне відхилення).

Таблиця 27. Оцінка компонентів дисперсії внутрішньолабораторної прецизійності для частот варіантів у зразках зародкової лінії

Компонент	Середнє СВ	Середнє % від загального СВ
День	0,0020	1,028
Секвенатор	0,0018	0,837
Партія витратних матеріалів	0,0016	0,712
Повторність бібліотеки	0,0143	17,110
Усього	0,0370	100

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Соматичні варіанти

Для соматичних прогонів геномні позиції, у яких виявлено цільовий соматичний варіант, повідомляються як позитивні (варіант). Для розведених зразків GM12877-13 і GM12878-13 з очікуваними позитивними соматичними варіантами з VAF у діапазоні від 6,5 % до 13 % дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком позитивних визначень (PPC) у межах кожного типу варіанта (SNV, вставка, делеція). У таблиці [Спостереження щодо точності соматичних визначень у межах однієї лабораторії для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта \(VAF становить  \$\geq 6,5\%\$  і  \$\leq 13\%\$ \) на стор. 70](#) наведено зведення спостережених показників разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), розрахованими за методом оцінки Вілсона, для кожного типу варіанта.

Таблиця 28. Спостереження щодо точності соматичних визначень у межах однієї лабораторії для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта (VAF становить  $\geq 6,5\%$  і  $\leq 13\%$ )

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережені позитивні визначення <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPB
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Інсерція	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Делеція	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Позитивним визначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

Геномні позиції, у яких цільовий соматичний варіант не виявлено, повідомляються як негативні (дикий тип). Для очікувано негативних позицій дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком негативних визначень. У таблиці [Спостереження щодо точності соматичних визначень у межах однієї лабораторії для очікуваних негативних результатів на стор. 70](#) наведено зведення спостережених показників разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), розрахованими методом оцінки Вілсона, для кожного типу варіанта.

Таблиця 29. Спостереження щодо точності соматичних визначень у межах однієї лабораторії для очікуваних негативних результатів

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережувані негативні розпізнавання <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPB
Дикий тип	0	194922	0	194919	194922	> 99,99	> 99,99	100

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Негативне розпізнавання визначається як цільові хромосомні позиції, у яких не виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Внесок кожного параметра (секвенатор, серія реагентів, день, повторність бібліотеки) у загальну варіабельність визначали за допомогою аналізу компонентів дисперсії, де частота варіантів була залежною змінною (відгуком). Загальне стандартне відхилення в середньому становило 0,0062. Повторності підготовки бібліотек залишалися найзначущим джерелом варіабельності, становлячи 50,7 % від загального показника. День, секвенатор і партія витратних матеріалів вносили менше ніж 1 % у загальну варіабельність. Див. таблицю [Оцінки компонентів дисперсії точності в межах однієї лабораторії для частот варіантів у соматичних зразках на стор. 71](#) (СВ — стандартне відхилення).

Таблиця 30. Оцінки компонентів дисперсії точності в межах однієї лабораторії для частот варіантів у соматичних зразках

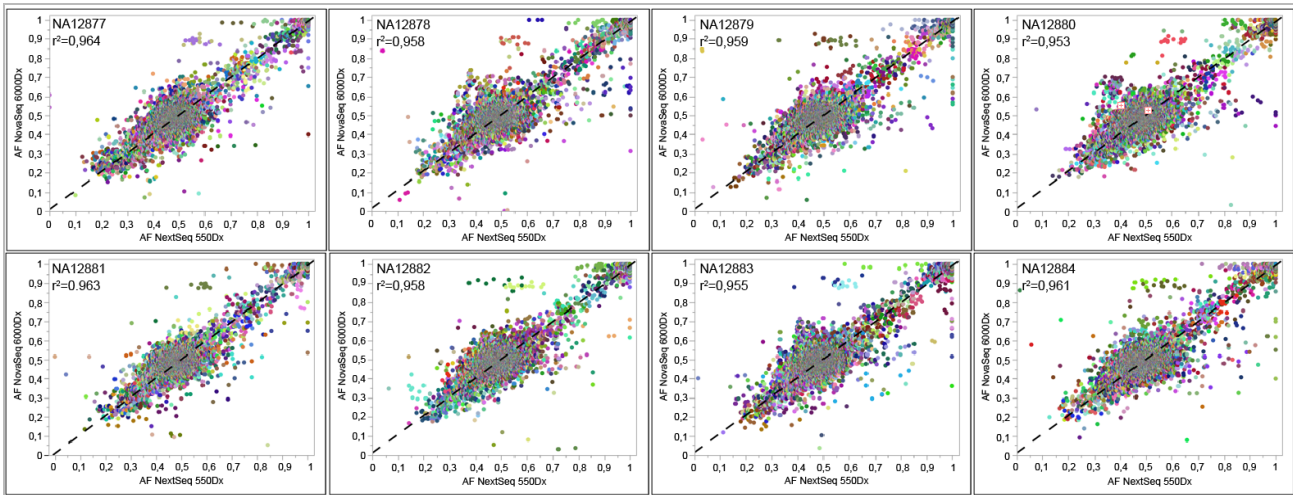
Компонент	Середнє СВ	Середнє % від загального СВ
День	0,0002	0,41
Секвенатор	0,0002	0,40
Партія витратних матеріалів	0,0002	0,35
Повторність бібліотеки	0,0044	50,7
Усього	0,0062	100

## Порівняння методів

Було проведено дослідження для порівняння робочих характеристик секвенаторів NovaSeq 6000Dx та NextSeq 550Dx. Узгодженість частот варіантів для зразків крові була оцінена за допомогою репрезентативного аналізу, розробленого для дослідження різноманітних генів, що покривають 1 970 505 основ у всіх 23 хромосомах людини. Було випробувано вісім зразків ДНК Platinum Genome: сім у шести технічних повторностях та один (NA12881) у п'яти повторностях. Бібліотеки секвенували на секвенаторі Секвенатор NovaSeq 6000Dx з використанням робочого процесу аналізу з генерацією файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, а також на секвенаторі NextSeq 550Dx з використанням модуля DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager. [Графіки кореляції частоти варіантів \(точки зафарбовано за унікальними варіантами; варіанти можуть бути зафарбовані по-різному на кожному окремому графіку\).](#) на стор. 72 відображають кореляцію VAF між двома секвенаторами для кожного зразка. На підставі сильної кореляції між секвенаторами Секвенатор NovaSeq 6000Dx і NextSeq 550Dx було встановлено, що технічні характеристики, пов'язані з преаналітичними факторами (наприклад, методами екстракції або інтерферувальними речовинами), є застосовними до обох секвенаторів. Для отримання додаткової інформації див. інструкцію з використання Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

Рисунок 15. Графіки кореляції частоти варіантів (точки зафарбовано за унікальними варіантами; варіанти можуть бути зафарбовані по-різному на кожному окремому графіку).



## Відтворюваність

Відтворюваність Секвенатора NovaSeq 6000Dx оцінювали із застосуванням зразків Platinum Genome та репрезентативного аналізу, розробленого для дослідження різних генів, що охоплюють 1 970 505 основ у 23 різних хромосомах із використанням 9232 цільових олігонуклеотидів. Загалом було оцінено 1723 цільові малі варіанти (SNV, вставки та делеції). Тестування гермінальних варіантів складалося з трьох або чотирьох повторів для дванадцяти унікальних зразків Platinum. Тестування соматичних варіантів складалося з п'яти або шести повторів для восьми унікальних зразків Platinum Genome, оброблених FFPE, на різних рівнях VAF. Бібліотеки зразків готували з використанням реагентів набору Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Тестування проводили на трьох зовнішніх майданчиках, використовуючи по одній партії кожного набору (Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів) і Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (на 300 циклів)). На кожному майданчику використовували один Секвенатор NovaSeq 6000Dx. У кожному центрі тестування проводили два оператори. Кожен оператор проводив тестування впродовж трьох непослідовних днів запуску для кожного типу зразків, що загалом становило 36 проточних кювет на трьох майданчиках. Для кожного дня початку бібліотеки гермінальних зразків секвенували на боці А секвенатора з використанням реагентів S2 та робочого процесу аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, а бібліотеки соматичних зразків секвенували на боці В секвенатора з використанням реагентів S4 та робочого процесу аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF соматичних варіантів у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. У результаті цього тестування було отримано 18 проточних кювет для кожного гермінального та соматичного робочих процесів.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Гермінальні варіанти

Для гермінальних прогонів геномні позиції, у яких виявлено цільовий гермінальний варіант, повідомляються як позитивні (варіант). Для очікуваних позитивних гермінальних варіантів дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком позитивних визначень (PPC) у межах кожного типу варіанта (SNV, вставка, делеція). Таблиця [Спостереження щодо гермінальних визначень для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта на стор. 73](#) узагальнює спостережені показники разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), обчисленими за методом оцінки Вілсона, для кожного типу варіанта.

Таблиця 31. Спостереження щодо гермінальних визначень для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережені позитивні визначення <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPB
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Інсерція	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Делеція	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Позитивним визначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

Геномні позиції, у яких цільового варіанта не виявлено, повідомляються як негативні (дикий тип). Для очікуваних негативних позицій дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком негативних визначень (PNC). Таблиця [Спостереження щодо гермінальних визначень для очікуваних негативних результатів на стор. 73](#) узагальнює спостережені показники разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), обчисленими за методом оцінки Вілсона.

Таблиця 32. Спостереження щодо гермінальних визначень для очікуваних негативних результатів

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережувані негативні розпізнавання <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPB
Дикий тип	0	393516	0	393516	393516	100	> 99,99	100

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Негативне розпізнавання визначається як цільові хромосомні позиції, у яких не виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

# Інструкція з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx illumina®

## Соматичні варіанти

Для соматичних прогонів геномні позиції, у яких виявлено цільовий соматичний варіант, повідомляються як позитивні (варіант). Для очікуваних позитивних соматичних варіантів, де середня частота варіантних алелів (VAF) становить від 14 % до 28 % включно, дані оцінювали за показниками частоти нерозпізнавань та відсотка позитивних розпізнавань (PPC) для кожного типу варіанта (SNV, інсерція, делеція). У таблиці [Спостереження соматичних варіантів для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта \(середня VAF  \$\geq 14\$  та  \$\leq 28\$ \) на стор. 74](#) для кожного типу варіанта підбито підсумок отриманих частот, а також нижньої й верхньої межі рівня вірогідності 95 % (HPV/BPV), обчислених за методом оцінки Вілсона.

Таблиця 33. Спостереження соматичних варіантів для очікуваних позитивних результатів за типом варіанта (середня VAF  $\geq 14$  та  $\leq 28$ )

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережені позитивні визначення <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPV
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Інсерція	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Делеція	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Позитивним визначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

Геномні позиції, у яких цільовий соматичний варіант не виявлено, повідомляються як негативні (дикий тип). Для очікувано негативних позицій дані оцінювали за частотою невизначень і відсотком негативних визначень. У таблиці [Спостереження розпізнавання соматичного варіанта для очікуваних негативних результатів на стор. 74](#) наведено зведення спостережених показників разом із нижньою та верхньою 95 % довірчими межами (LCL/UCL), розрахованими за методом оцінки Вілсона, для кожного типу варіанта.

Таблиця 34. Спостереження розпізнавання соматичного варіанта для очікуваних негативних результатів

Тип варіанта	Спостережені невизначення <sup>1</sup>	Загальна кількість визначень	Відсоток невизначень	Спостережувані негативні розпізнавання <sup>2</sup>	Загальна кількість оцінюваних визначень	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % BPV
Дикий тип	0	92718	0	92714	92718	> 99,99	99,99	100

<sup>1</sup> Невизначенням вважається цільова хромосомна позиція, у якій варіант неможливо визначити (через низьку глибину покриття).

<sup>2</sup> Негативне розпізнавання визначається як цільові хромосомні позиції, у яких не виявлено варіант.

<sup>3</sup> Двобічні 95 % довірчі інтервали, розраховані за методом оцінки Вілсона.

## Історія редакцій

Документ	Дата	Опис зміни
Документ № 200025276, вер. 01	Вересень 2022 р.	Оновлено дані щодо точності спостережень розпізнавань зародкової лінії.
Документ № 200025276, вер. 00	Серпень 2022 р.	Початкова редакція.

## Патенти й товарні знаки

Цей документ і його вміст є власністю компанії Illumina, Inc. та її філій (надалі — Illumina). Він призначений лише для того, щоб користувач використовував вироби тільки за угодою в цілях, описаних у цьому документі. Цей документ і його вміст не слід використовувати або поширювати з будь-якою іншою метою та/або для іншого обговорення, розкриття або відтворення тим або іншим чином без попередньої письмової згоди компанії Illumina. Цим документом компанія Illumina не надає жодного дозволу на свій патент, товарний знак, авторське право або загальноприйняті права, а також на подібні права будь-яких третіх сторін.

Щоб гарантувати правильне та безпечне використання виробів, описаних у цьому документі, кваліфікований і належним чином навчений персонал повинен суворо та чітко дотримуватись інструкцій, описаних у цьому документі. Перед використанням цих виробів потрібно повністю прочитати й зрозуміти весь вміст цього документа.

НЕПОВНЕ ВИВЧЕННЯ ВСІХ ЗАЗНАЧЕНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ ВКАЗІВОК І ЇХ НЕЧІТКЕ ДОТРИМАННЯ МОЖЕ ПРИЗВОДИТИ ДО ПОШКОДЖЕННЯ ЦИХ ВИРОБІВ, ТРАВМУВАННЯ ЛЮДЕЙ, ЗОКРЕМА КОРИСТУВАЧІВ АБО ІНШИХ ОСІБ, І ДО ПОШКОДЖЕННЯ ІНШОЇ ВЛАСНОСТІ, А ТАКОЖ ПРИЗВЕДЕ ДО ВТРАТИ БУДЬ-ЯКИХ ГАРАНТІЙНИХ ЗОБОВ'ЯЗАНЬ, ЗАСТОСОВНИХ ДО ЦИХ ВИРОБІВ.

КОМПАНІЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕ ЖОДНОЇ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ, ЩО ВИНΙΚАЄ ВНАСЛІДОК НЕНАЛЕЖНОГО ВИКОРИСТАННЯ ВИРОБІВ, ОПИСАНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ (ВКЛЮЧНО З ЙОГО ЧАСТИНАМИ АБО ПРОГРАМНИМ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯМ).

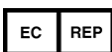
© 2022 Illumina, Inc. Усі права застережено.

Усі товарні знаки є власністю компанії Illumina, Inc. або їхніх відповідних власників. Конкретну інформацію про товарні знаки зазначено на сторінці [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Контактна інформація



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A. (США)  
+1 800 809.ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (за межами Північної Америки)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
The Netherlands (Нідерланди)

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

## Маркування виробу

Повний список символів, які може бути зображено на пакованні або маркуванні виробу, див. у поясненні символів на вебсайті [support.illumina.com](http://support.illumina.com) у вкладці *Documentation* (Документи) для вашого набору.