

Ulotka dołączona do opakowania

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO.

Przeznaczenie

TruSight™ Whole Genome jest jakościowym narzędziem diagnostycznym *in vitro* przeznaczonym do sekwencjonowania całego genomu i wykrywania wariantów pojedynczego nukleotydu, insercji/delecji, polimorfizmu liczby kopii, przebiegów homozygotyczności, krótkich powtórzeń tandemowych i zmian mitochondrialnych ludzkiego DNA genomowego wyizolowanego z krwi.

TruSight Whole Genome zawiera wraz TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes i oprogramowaniem TruSight Whole Genome Analysis Application. Urządzenie jest przeznaczone do stosowania z kompatybilnymi aplikacjami linii zarodkowej w celu opracowania testów diagnostycznych *in vitro* oraz przez wykwalifikowany personel laboratoryjny i osoby opracowujące testy.

TruSight Whole Genome jest przeznaczony do stosowania z NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Podsumowanie i wyjaśnienie zasady działania

TruSight Whole Genome jest testem sekwencjonowania nowej generacji, który wykorzystuje przygotowanie biblioteki bez reakcji PCR opartej na tagmentacji, począwszy od genomowego DNA (gDNA) wyizolowanego z krwi obwodowej pełnej ludzkiej oraz sekwencjonowania i analizy głównej w Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Analizę wtórną przeprowadza się przy użyciu oprogramowania TruSight Whole Genome Analysis Application za pomocą dołączonego i wymaganego Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx i obejmuje ona demultipleksację, dopasowanie do genomu odniesienia ludzkiego GrCh38/hg38 oraz rozpoznanie wariantów, a także adnotację i zastosowanie specyfikacji parametrów kontroli jakości (QC) [Tabela 1](#) w celu zapewnienia wydajności analitycznej. Wyniki testów obejmują raporty kontroli jakości przebiegów i próbek oraz pliki rozpoznania wariantów genomu (VCF) do użytku z kompatybilnym oprogramowaniem do analizy i raportowania.

TruSight Whole Genome szeroko ocenia warianty genomowe w regionach kodujących i niekodujących genomu ludzkiego. Ocena wariantów obejmuje wykrywanie małych wariantów, polimorfizmu liczby kopii (CNV), przebiegów homozygotycznych (ROH) i ekspansji krótkich powtórzeń tandemowych (STR). Ponadto TruSight Whole Genome wykrywa brak allelu SMN1 c.840C (NM_000344.3:c.840C>T), co może wskazywać na delecję genu SMN1 lub konwersję genu SMN1/SMN2.^{1,2} Utrata dwualeliczna SMN1 c.840C jest odpowiedzialna za około 95% przypadków rdzeniowego zaniku mięśni (SMA).³

[Tabela 2](#) zawiera informacje o typach wariantów zatwierdzonych za pomocą TruSight Whole Genome.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Tabela 1 TruSight Whole Genome Specyfikacje wskaźników jakości

| Typ wyniku | Metryka | Specyfikacja |
|---|--|--------------------------|
| Kontrola jakości przebiegu sekwencjonowania | Łącznie % \geq Q30 | $\geq 85,0$ |
| QC FASTQ | Wydajność na próbkę (pz) | $\geq 90\,000\,000\,000$ |
| Kontrola jakości biblioteki próbek | Średnie pokrycie autosomalne | $\geq 35,0$ |
| | Odsetek autosomów z pokryciem przekraczającym 20x | $\geq 93,94$ |
| | Znormalizowane pokrycie dla kategorii GC od 60% do 79% | $0,82 \leq x \leq 1,13$ |
| | Znormalizowane pokrycie kategorii GC od 20% do 39% | $0,97 \leq x \leq 1,06$ |
| | Średnie pokrycie mitochondrialne | $\geq 500,0$ |
| | Odsetek nukleotydów Q30 | $\geq 85,0$ |
| | Szacowane zanieczyszczenie próbki | $\leq 0,005$ |

Tabela 2 Wykryte warianty zwalidowane przez TruSight Whole Genome

| Typ wariantu | Zwalidowane wykrywanie wariantów |
|--|--|
| Małe warianty | Warianty pojedynczego nukleotydu (SNV), krótkie insercje/delecje (1–31 pz) |
| Polimorfizm liczby kopii (CNV) | Uzysk i utrata ≥ 10 kb |
| Przebiegi homozygotyczne (ROH) | ≥ 500 kb |
| Mitochondrialne SNV | % heteroplazmii, jeśli $\geq 4,75\%$ |
| Ekspansje krótkich powtórzeń tandemowych (STR) | Docelowe loci (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNpz, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PApzN1, PHOX2B, PPP2R2B, i TBP) |
| Wariant SMN1 | NM_000344,3:c.840C/T |

Zasada procedury

TruSight Whole Genome jest przeznaczony do przygotowywania bibliotek wolnych od reakcji PCR w celu uzyskania danych sekwencjonowania ludzkiego całego genomu. Test rozpoczyna się od przygotowania bibliotek z genomowego DNA wyizolowanego z obwodowej ludzkiej krwi pełnej, obejmuje sekwencjonowanie i

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

analizę w NovaSeq 6000Dx Instrument przy użyciu TruSight Whole Genome Analysis Application, a kończy się rozpoznaniem wariantu i adnotacją.

Procedura testu TruSight Whole Genome obejmuje następujące etapy:

- **Planowanie partii i tworzenie przebiegu** – zdecydowanie zaleca się zaplanowanie partii i przebiegu przed rozpoczęciem przygotowywania biblioteki. W partii przygotowania biblioteki można przygotować do 24 bibliotek próbek. W zależności od liczby próbek mogą być stosowane różne konfiguracje komórek przepływu (6-pleks na S2 i 16-pleks na S4). Identyfikator probówki Library, nazwy próbek i odpowiednie indeksowanie są rejestrowane podczas planowania i tworzenia przebiegu. Aby uzyskać więcej informacji na temat tworzenia przebiegu, patrz TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931). Śledź planowaną partię podczas wykonywania przepływu pracy przygotowania biblioteki.
- **Przygotowanie do protokołu** – niektóre odczynniki są zamrożone i należy je doprowadzić do temperatury pokojowej. Ze względu na krótki przepływ pracy możliwe jest ukończenie przygotowań i rozpoczęcie sekwencjonowania tego samego dnia. Zatem podczas tego etapu można również rozmrozić materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania dla planowanych przebiegów. Kwantyfikowane próbki genomowego DNA są rozmrażane i rozcieńczane w celu zoptymalizowania danych wejściowych DNA.
- **Przygotowanie bibliotek**
 - **Tagmentacja genomowego DNA** – wykorzystuje bead-linked transposomes PCR-Free (BLT-PF) do tagmentacji wejściowej ilości DNA. Podczas tagmentacji gDNA jest dzielony na fragmenty, oznaczany adapterami i unieruchamiany na powierzchni kulek magnetycznych BLT-PF.
 - **Czyszczenie po tagmentacji** – czyszczenie DNA oznaczonego adapterem BLT-PF i usunięcie buforu zatrzymania, aby przygotować się do etapu ligacji indeksów.
 - **Ligacja indeksów** – dodaje unikatowe dwa indeksy do bibliotek, aby umożliwić multipleksowanie. Wykonuje rozszerzenie luki i wymywa jednoniciowe biblioteki DNA z kuleczek.
 - **Wybór rozmiaru i czyszczenie bibliotek** – procedura oczyszczania kulek z dwustronnym wyborem rozmiaru usuwa fragmenty zbyt małe i zbyt duże, aby osiągnąć medianę długości fragmentu około 450 pz, zakres ~360 do 550 pz.
 - **Pulowanie i denaturacja bibliotek** – funkcja samonormalizacji BLT-PF umożliwia łączenie według objętości bez qPCR lub innej normalizacji. Określona objętość każdej biblioteki jest zbiorcza zgodnie z planem dla każdego przebiegu i denaturowana za pomocą 0,2N NaOH (rozcieńczony HP3). Zdenaturowana pula jest następnie przenoszona do probówki Library NovaSeq 6000Dx o identyfikatorze odpowiadającym planowanemu przebiegowi.
- **Sekwencjonowanie i analiza** – materiały eksploatacyjne w konfiguracji S2 i/lub S4 są ładowane do aplikacji NovaSeq 6000Dx Instrument, w tym powiązane probówki Library NovaSeq 6000Dx z pulą bibliotek. Po załadowaniu identyfikator probówki Library jest skanowany i, jeśli zostanie wprowadzony podczas planowania przebiegu, jest używany do wyboru odpowiedniego zaplanowanego przebiegu. W przeciwnym razie należy ręcznie wybrać powiązany zaplanowany przebieg.
Biblioteki w puli są łączone w klastry w komorze przepływowej, a następnie sekwencjonowane za pomocą technologii sekwencjonowania przez syntezę (SBS) w NovaSeq 6000Dx. W technologii sekwencjonowania przez syntezę stosowana jest metoda terminatora odwracalnego służąca do wykrywania znakowanych fluorescencyjnie pojedynczych nukleotydów w miarę ich wbudowywania do rosnących łańcuchów DNA.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Oprogramowanie Real-Time Analysis (RTA) wykonuje analizę wstępną, która obejmuje rozpoznawanie nukleotydów oraz przypisuje wynik jakościowy do każdego rozpoznanego nukleotydu. Dane analizy podstawowej są automatycznie przesyłane do serwera Illumina DRAGEN.

Demultipleksacja i analiza DRAGEN są wykonywane automatycznie za pomocą TruSight Whole Genome Analysis Application. W ramach tej analizy każda biblioteka testów i próbek jest sprawdzana pod kątem ważności przy użyciu parametrów analitycznych opisanych w punkcie [Kontrola jakości na stronie 35](#), a wyniki są dostarczane w skonsolidowanych i pojedynczych raportach próbek. W przypadku prawidłowych bibliotek próbek generowane są pliki z adnotacjami dotyczącymi wariantów rozpoznania genomu (VCF). Więcej informacji na temat procedury pracy analizy można znaleźć w TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931).

Ograniczenia dotyczące procedury

- Do celów diagnostyki *in vitro*.
- TruSight Whole Genome jest kompatybilny z genomowym DNA pochodzącym z ludzkiej obwodowej krwi pełnej.
- Test nie zawiera odczynników do izolacji ani oznaczenia ilościowego DNA. Wyniki badań analitycznych, w tym [Substancje zakłócające na stronie 41](#), uzyskano w badaniu krwi pełnej przy użyciu reprezentatywnych zestawów do izolacji DNA i zestawów do oznaczania ilościowego DNA. Wszystkie testy diagnostyczne opracowane do stosowania z TruSight Whole Genome wymagają pełnej walidacji dla wszystkich aspektów działania wybranego zestawu do izolacji DNA i zestawu do ilościowej oceny DNA.
- Test został skonfigurowany i przetestowany dla zestawów wielokrotności próbek i indeksów próbek wskazanych w poniższej tabeli.

| Rozmiar partii przygotowanej biblioteki | Krotność | Konfiguracja przebiegu | Indeksowanie |
|---|----------------------|-------------------------------|--|
| 6, 12, 18 lub 24 próbki | 6-krotny | 1-4 przebiegi S2 | Zestaw S2 1 do 4 |
| 16 próbek | 16-krotny | 1 przebieg S4 | Zestaw S4 1 lub 2 |
| 22 próbki | 16-krotny + 6-krotny | 1 przebieg S4 + 1 przebieg S2 | Zestaw S4 1 lub 2, zestaw S2 1 do 4 (nieużywany do zestawu S4) |

- Test nie wymusza dodatkowego śledzenia próbek. Chociaż sumaryczny wynik kontroli jakości ploidalności zgłoszony przez oprogramowanie może opcjonalnie zostać wykorzystany do identyfikacji zamiany próbek, nie będzie on identyfikować mężczyzn zamienionych z mężczyznami lub kobiet zamienionych z kobietami.
- Test zapewnia walidację tylko do wyników plików VCF genomu. Wszystkie testy diagnostyczne opracowane do stosowania z odczynnikami TruSight Whole Genome wymagają pełnej walidacji dla wszystkich aspektów działania wybranego zestawu do zastosowania.
- Test nie zgłasza rozpoznania wariantów dla próbek, które nie spełniają wymagań kontroli jakości.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- Test definiuje poziomy wysokiego poziomu ufności tylko dla SNV i insercji/delecji 1–5 pz ze względu na ściśle kryteria stosowane do zdefiniowania kontekstu genomowego jako wysokiego poziomu ufności dla danego typu wariantu w [Ustalenie poziomu ufności dla małych wariantów na stronie 43](#).
- Test ma na celu ocenę CNV w całym raportowalnym genomie, niezależnie od kontekstu genomowego, i wyklucza regiony z cechami odzwierciedlającymi ograniczenia genomu referencyjnego, takimi jak centromery, telomery i wspólne CNV segregujące się w populacjach.
- Wydajność testu nie została oceniona dla wariantów liczby kopii poniżej 10 kpz.
- Test nie zgłasza translokacji, odwracania ani zrównoważonych rearanżacji.
- Nie oceniano wydajności testu pod kątem insercji lub delecji DNA mitochondrialnego (mtDNA).
- Test zgłasza tylko wyniki dla loci STR wymienione w [Tabela 2](#). Gdy rzeczywista długość Ekspansji STR przekracza około 135 pz, obserwowana długość często będzie niedoszacowaniem rzeczywistej długości ze względu na techniczne ograniczenia krótkich odczytów, a to będzie jeszcze bardziej widoczne dla FMR1. Gdy rzeczywista długość STR przekroczy średnią długość fragmentu (~330 pz), szacowana długość STR będzie równa płaszczyznom.
- Oznaczenie nie podaje liczby kopii SMN1 ani SMN2.
- Test nie podaje informacji o patogenności wykrytych wariantów.

Składniki produktu

TruSight Whole Genome składa się z następujących elementów:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (nr katalogowy 20093209) oraz
- TruSight Whole Genome Analysis Application (nr katalogowy 20106190, zainstalowany przez przeszkolony personel Illumina)

Odczynniki

Dostarczone odczynniki

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

| Nazwa odczynnika | Ilość | Objętość wypełnienia | Składniki aktywne | Temperatura przechowywania |
|--|-------|----------------------|--|----------------------------|
| Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) | 1 | 460 µl | Streptavidin magnetic beads połączone z transposomem w buforowanym roztworze wodnym. | Od -25°C do -15°C |
| Extension Ligation Mix (ELM) | 1 | 1,6 ml | Ligaza, DNA polymerase i dNTP w buforowanym roztworze wodnym. | Od -25°C do -15°C |
| 2N NaOH (HP3) | 1 | 400 µl | 2 N roztwór wodorotlenku sodu (NaOH). | Od -25°C do -15°C |
| Tagmentation Buffer 1 (TB1) | 1 | 290 µl | Buforowany roztwór wodny zawierający sole magnezu i dimetyloformamid. | Od -25°C do -15°C |

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

| Nazwa odczynnika | Ilość | Objętość wypełnienia | Składniki aktywne | Temperatura przechowywania |
|-----------------------------------|-------|----------------------|---|----------------------------|
| Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2) | 1 | 41 ml | Buforowany roztwór wodny zawierający detergent i sole. | Od 15°C do 30°C |
| Resuspension Buffer (RSB) | 1 | 20 ml | Buforowany roztwór wodny. | Od 15°C do 30°C |
| Cleanup Beads (CB) | 1 | 10 ml | Kuleczki paramagnetyczne tworzące fazę stałą zawieszona w buforowanym roztworze wodnym. | Od 15°C do 30°C |
| Stop Tagment Buffer 2 (ST2) | 1 | 1,4 ml | Roztwór detergentu w wodzie. | Od 15°C do 30°C |
| Neutralization Buffer (NB) | 1 | 450 µl | Roztwór Tris-HCl. | Od 15°C do 30°C |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

| Nazwa odczynnika | Ilość | Objętość wypełnienia | Składniki aktywne | Temperatura przechowywania |
|---------------------------|-------|----------------------|--|----------------------------|
| UDI PCR-Free (32 Indexes) | 1 | 37 µl | Unikalne adaptory podwójnie indeksowane (UD) umieszczone w płytce. | Od -25°C do -15°C |

Materiały eksploatacyjne wymagane, ale niedostarczane

- Etanol, 100% (absolutny) do zastosowań w biologii molekularnej
- RNase/DNase-free water z certyfikatem
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cykli) (nr katalogowy 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cykli) (nr katalogowy 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (nr kat. 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (nr kat. 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (nr katalogowy 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (nr katalogowy 20062291)

Przechowywanie i sposób postępowania

- Temperaturę pokojową zdefiniowano jako 15°C do 30°C.
- Jeśli jakiegokolwiek opakowanie lub zawartość składników TruSight Whole Genome Dx Library Prep są uszkodzone lub ich jakość jest w jakikolwiek inny sposób pogorszona, należy skontaktować się z działem obsługi klienta firmy Illumina.
- Odczynniki zachowują stabilność do terminu ważności podanego na etykietach zestawu pod warunkiem przechowywania zgodnie ze wskazaniem. Warunki przechowywania podano w części [Dostarczone odczynniki na stronie 6](#). Przechowywać składniki testu w określonej temperaturze i nie używać przeterminowanych odczynników. Nie należy mieszać składników z różnych partii zestawów. Numery partii testu znajdują się na etykietach umieszczonych na opakowaniach testu.
- Zmiany fizycznego wyglądu odczynników mogą wskazywać na pogorszenie się stanu materiałów. Jeśli wystąpią zmiany wyglądu fizycznego (np. oczywiste zmiany koloru odczynnika lub zmętnienie), nie należy używać odczynników. W przypadku zaobserwowania osadu w ST2, ogrzewać w temperaturze 37°C przez 10 minut, a następnie wymieszać na wytrząsarce typu wortex aż do rozpuszczenia osadu.
- Przeprowadzono ocenę stabilności testu TruSight Whole Genome Dx Library Prep i wykazano działanie w przypadku maksymalnie czterech zastosowań zamrożonych próbek, jeśli były zamrażane pomiędzy kolejnymi użyciami.

Sprzęt i materiały

Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

Przed rozpoczęciem testu należy sprawdzić stan kalibracji sprzętu.

| Wyposażenie | Dostawca |
|---|--|
| Wymieszać na wytrząsarce typu worteks o prędkości obrotowej 3000 obr./min, z płaskim dnem lub pojemnikiem | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Inkubator z mikropróbką skalibrowany w celu zapewnienia dokładności temperatury $\pm 2^{\circ}\text{C}$ | SciGene, nr katalogowy 1057-30-O (lub odpowiednik) |
| Inkubator do mikropróbek z wkładką grzejącą na 96-dołkowe płytki MIDI | Illumina, nr katalogowy BD-60-601 |
| Mikrowirówka | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Wirówka do mikroplatek 96-dołkowa | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Wytrząsarka płytek o następujących cechach: <ul style="list-style-type: none">Może wytrząsać z prędkością 1800 obr./minStała orbity mieszania 2 mmDokładność mieszania ± 25 obr/min | VWR, numer katalogowy 1808-0506 (lub odpowiednik) |
| Klin lub wałek do uszczelniania | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Statyw magnetyczny o następujących parametrach: <ul style="list-style-type: none">Zaprojektowany do strącania/separacji kulek paramagnetycznychMagnezy z boku, a nie dołu, statywuDo 96-dołkowych płytek MIDI | Thermo Fisher Scientific, nr kat. AM10027 (lub równoważne) |
| NovaSeq 6000Dx Instrument | Illumina, numer katalogowy 20068232 |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Wyposażenie | Dostawca |
|---|---|
| Precyzyjne pipety (jednokanałowe): <ul style="list-style-type: none">• 10 µl• 20 µl• 200 µl• 1000 µl | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Precyzyjne pipety (8-kanałowe): <ul style="list-style-type: none">• 20 µl• 200 µl | |
| Upewnić się, że pipety są kalibrowane systematycznie i dokładne w zakresie 5% podanej objętości | |
| Pipeta pomocnicza | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |

Materiały wymagane, ale niedostarczane

Przed rozpoczęciem realizacji procedury należy się upewnić, że wymagane materiały są na miejscu.

Procedura została zoptymalizowana i zwalidowana przy użyciu wymienionych elementów. W przypadku użycia innych materiałów nie gwarantuje się porównywalnego działania.

| Materiały | Dostawca |
|---|---|
| Pipety serologiczne 5 ml | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Pipety serologiczne o poj. 10 ml | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Samoprzylepna folia uszczelniająca do płytek 96-dołkowych o następujących cechach: <ul style="list-style-type: none">• Zrywalna, optycznie przezroczysta, wykonana z poliestru• Mocna folia samoprzylepna, która wytrzymuje wielokrotne zmiany temperatury w zakresie od -40°C do 110°C• Pozbawiona DNase/RNase | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Probówki do mikrowirówek, nie zawierające nukleazy (1,5, 1,7 lub 2,0 ml, chyba że określono je jako 0,5 ml) | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Materiały | Dostawca |
|--|---|
| Pozbawione nukleaz pojemniki na odczynniki, poj. 50 ml lub równoważna (PCW, jednorazowe korytko) | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Probówki stożkowe o poj. 15 ml | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Probówki stożkowe o poj. 50 ml | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Końcówki do pipet o poj. 20 µl z filtrem | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Końcówki do pipet o poj. 200 µl z filtrem | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Końcówki do pipet o poj. 1000 µl z filtrem | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| 96-dołkowe płytki do przechowywania; poj. dołka 0,8 ml (płytki MIDI) | Thermo Fisher Scientific, nr kat. AB-0859 (lub odpowiednik) |
| 96-dołkowe płytki PCR, 0,2 ml (polipropylen niezawierający RNAzy/DNAzy, niskowiążący). | Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych |
| Pojemnik na lód i lód | Nie dotyczy |
| Próbki genomowego DNA oznaczone ilościowo | Nie dotyczy |

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek



PRZESTROGA

Wszelkie próbki należy traktować jako potencjalnie zakaźne.

- Podczas pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek krwi ludzkiej należy przestrzegać procedur bezpieczeństwa, w tym stosowania środków ochrony osobistej.
- Transport krwi pełnej musi się odbywać zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi lub lokalnymi w zakresie transportu czynników etiologicznych.
- Pobrać 2–5 ml krwi obwodowej do probówek z EDTA i przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C przez maksymalnie pięć tygodni przed izolacją.
- Nie zaobserwowano negatywnego wpływu na działanie testu w przypadku próbek krwi pełnej z podwyższonym poziomem bilirubiny, hemoglobiny, trójglicerydów, biotyny oraz EDTA. Patrz Substancje zakłócające.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- TruSight Whole Genome jest kompatybilny z dostępnymi na rynku zestawami do izolacji i protokołami, które są odpowiednie do stosowania w sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS). Patrz [Ocena metody izolacji DNA na stronie 40](#).
- TruSight Whole Genome jest kompatybilny z DNA poddawanym elucji w buforowanym roztworze Tris zawierającym ≤ 10 mM EDTA, takim jak 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Zaleca się elucję i przechowywanie DNA w TE. W celu zapewnienia stabilności należy unikać przechowywania w wodzie.

Zalecenia dotyczące wejściowej ilości DNA

- Przed rozpoczęciem testu TruSight Whole Genome należy określić ilościowo genomowy DNA wyizolowany z krwi pełnej przy użyciu dowolnej metody fluorometrycznego oznaczania ilościowego, która wykorzystuje barwniki wiążące kwas nukleinowy. Zaleca się, aby gDNA dla próbek przeznaczonych do określonej partii przygotowanej biblioteki i przebiegu sekwencjonowania były oznaczane ilościowo razem w celu wyeliminowania zmienności między partiami, gdy jest to możliwe, lub aby zastosowano kontrole procesu w celu zapewnienia $\leq 25\%$ zmienności ilościowej pomiędzy partiami w DNA.
- Należy unikać pipetowania małych objętości próbek ($< 2 \mu\text{l}$), aby zapewnić dokładną analizę ilościową DNA i ilość wejściową.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep wymaga wystarczającej ilości DNA, aby nasycić kuleczki BLT-PF w celu skutecznej autonormalizacji wydajności biblioteki i optymalnej wydajności. Ze względu na zmienność wyników z różnych metod oznaczania ilościowego, w poniższej tabeli przedstawiono zalecane ilości wejściowe DNA dla trzech metod oznaczania ilościowego w celu zapewnienia optymalnej wydajności oznaczenia. Zastosowanie innych metod oznaczania ilościowego może wymagać optymalizacji. Patrz [Czułość na poziom wejściowy DNA na stronie 41](#).

| Metoda ilościowa | Ilość wejściowa docelowego DNA (ng) | Minimalne stężenie podstawowego roztworu DNA |
|---|-------------------------------------|--|
| Zestaw testu Quant-iT PicoGreen dsDNA | 280 | 11,2 ng/ μl |
| Zestaw testowy Qubit dsDNA o szerokim zasięgu (BR) | 280 | 11,2 ng/ μl |
| Zestaw do oznaczania ilościowego AccuClear dsDNA o bardzo wysokiej czułości | 350 | 14 ng/ μl |

Zalecenia dotyczące biegłości

Biegłość operatora i pomyślne wdrożenie testu można ocenić, wykonując jeden raz pełny przebieg pracy zgodnie z instrukcją użycia. Ten przebieg pracy można wykonać poprzez pojedyncze przygotowanie biblioteki składającej się z 6 próbek i sekwencjonowania przy użyciu komórki przepływu S2 lub poprzez pojedyncze przygotowanie biblioteki składającej się z 16 próbek i sekwencjonowania przy użyciu komórki przepływu S4. Powodzenie jest wskazywane przez przekazanie pomiarów kontroli jakości cyklu i biblioteki zapisanych w skonsolidowanym raporcie przygotowanym przez oprogramowanie TruSight Whole Genome Analysis Application. Patrz TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931).

illumina zaleca włączenie genomowych próbek DNA wyizolowanego z obwodowej krwi pełnej, które spełniają kryteria kwalifikacyjne pod kątem stężenia bazowego i objętości DNA w celu wykazania pomyślnej integracji testów z wcześniejszymi procesami laboratoryjnymi, takimi jak pobieranie i przechowywanie próbek oraz procedury izolacji i oznaczania ilościowego DNA. Można również wykorzystać dostępne na rynku próbki referencyjne DNA pochodzące od pojedynczego dawcy ludzkiego, takie jak NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium).

W przypadku wystąpienia problemów należy zapoznać się z punktem [Rozwiązywanie problemów na stronie 72](#) w celu uzyskania informacji na temat zalecanych działań i skontaktować się z działem pomocy technicznej illumina.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- **Niektóre elementy tego oznaczenia zawierają potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i pozbywać się ich zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Karty charakterystyki (SDS) są dostępne na stronie support.illumina.com/sds.html.**
- Wszelkie poważne incydenty związane z tym produktem należy niezwłocznie zgłaszać do illumina i właściwych organów państw członkowskich, w których użytkownik ma siedzibę i/lub pacjent mieszka.
- Ze wszystkimi próbkami należy postępować jak z próbkami potencjalnie zakaźnymi.
- Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.
- W tym oznaczeniu stosuje się glikol polietylenowy. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- W tym oznaczeniu stosuje się wodorotlenek sodu. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu.
- Procedury przygotowania biblioteki wymagają środowiska pozbawionego RNaz/DNaz. Dokładnie zdekontaminować obszary robocze środkiem czyszczącym hamującym działanie RNaz/DNaz.
- Używać probówek mikrowirowniczych, płytek, końcówek pipet i zbiorników pozbawionych nukleaz.
- Do testu należy używać wykalibrowanego sprzętu. Sprzęt należy skalibrować w zakresie prędkości, temperatur i objętości określonych w tym protokole.
- Używać pipet automatycznych, aby zapewnić dokładne odmierzanie odczynników i próbek. Kalibrację należy przeprowadzać regularnie, zgodnie ze specyfikacją producenta.
- Upewnić się, że używany sprzęt ma parametry zgodne ze specyfikacjami dla tego testu, a programy są ustawiane zgodnie z zaleceniami.
- Podane temperatury inkubatora mikropróbek wskazują nastawę temperaturę reakcji, a niekoniecznie temperaturę w urządzeniu.
- Nie należy mieszać elementów zestawów pochodzących z różnych partii TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Numery partii znajdują się na etykiecie umieszczonej na opakowaniu.
- Aby zapobiec zanieczyszczeniu odczynników, przyrządu, próbek i bibliotek nukleazami i produktami reakcji PCR, konieczne jest przestrzeganie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Zanieczyszczenie nukleazami i produktami reakcji PCR może powodować uzyskanie niedokładnych i niepewnych wyników.
- Dla zapewnienia optymalnego działania testu i przechowywania wymagany jest właściwy typ płytki. Należy przestrzegać instrukcji dotyczących przenoszenia próbek podanych w [Instrukcja użytkowania na stronie 17](#).
- Jeśli uszczelki płytki nie zostaną starannie nałożone lub zdjęte, może dojść do zanieczyszczenia krzyżowego lub utraty próbki (patrz punkt [Płytki przygotowawcze biblioteki obsługi na stronie 15](#)).
- Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości biblioteki.
- Odczynniki lub elementy testu należy przechowywać w określonej temperaturze.
- Odczynników nie należy przechowywać w komorze bezszronowej.
- Nie używać odczynników, które były przechowywane w nieprawidłowych warunkach.
- Nie należy używać żadnego ze składników zestawu po upływie podanego terminu ważności.
- Przygotować świeży 0,2N NaOH (rozcieńczony HP3) w dniu użycia i wyrzucić pozostałą objętość po użyciu.
- Przygotować świeży etanol 80% z RNaz/DNaz-free water w dniu użycia. Etanol może pochłaniać wodę z powietrza, co może wpływać na wyniki. Po użyciu roztwór 80% etanolu należy wyrzucić zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi. Stosować etanol o czystości do zastosowań w biologii molekularnej.

Uwagi dotyczące procedury

Porady i techniki

Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego

- Podczas dodawania lub przenoszenia próbek należy zmieniać końcówki pomiędzy *poszczególnymi próbkami*.
- Podczas dodawania adapterów lub starterów za pomocą pipety wielokanałowej należy zmieniać końcówki między poszczególnymi *dołkami*.
- Starannie uszczelnić i rozszczelnić płytki na stole, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu próbki.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia, każda studzienka indeksująca jest przeznaczona do jednorazowego użytku.
- Użyć wskazanych objętości minimalnych i nie wlewać pozostałej objętości z korytka z powrotem do probówek na zapas, ponieważ może to spowodować zanieczyszczenie. Ilość jest wystarczająca do obsługi procedury pracy.
- Nie należy łączyć ze sobą bibliotek z różnych materiałów przygotowawczych.

Dokładność pipetowania

Podczas stosowania pipet wielokanałowych należy przestrzegać poniższych wytycznych:

- Upewnić się, że końcówki barierowe są dobrze dopasowane i odpowiednie dla marki i modelu pipety wielokanałowej.
- Zamocować końcówki ruchem obrotowym tak, aby wszystkie były jednakowo dobrze dopasowane.
- Zaciągać płyn utrzymując równą objętością we wszystkich końcówkach.
- Powoli pipetować lepkie roztwory (BLT-PF, CB, ELM, TWB2).
- Po dozowaniu sprawdzić, czy płyn jest dozowany ze wszystkich końcówek.

Unikanie pienienia

- Odmierzyć pipetą powoli i odwrócić, aby wymieszać. Nie mieszać na wytrząsarce typu worteks ELM i TWB2.

Obsługa płyt indeksowania

- Uszczelnienie folii przekuwającej tylko w przypadku indeksów, które będą używane.
- Trzymać płytkę za krawędzie i unikać dotykania uszczelki foliowej czymś innym niż czyste końcówki pipety.
- Nie używać ponownie dołków, które zostały przebite.
- Niewykorzystaną objętość (~30 µl) należy wyrzucić po użyciu z przebitych dołków płytki indeksowania i umieścić uszczelkę na przebitych studzienkach, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego.
- Nie umieszczać uszczelki na nieużywanych dołkach, ponieważ zakłóca to przebicie.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Płytki przygotowawcze biblioteki obsługi

- Przed przechowywaniem, wstrząsaniem, inkubacją lub odwirowaniem należy zawsze szczelnie zamknąć płytkę.
- Aby uszczelnić płytkę, należy odpowiednio nałożyć na płytkę samoprzylepną folię, używając klina uszczelniającego lub wałka.
- Należy się upewnić, że krawędzie i dołki są całkowicie uszczelnione, aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego i parowania.
- Zawsze uszczelniać płytki nową folią uszczelniającą. Nie używać folii kilkakrotnie.
- Umieścić płytkę na płaskiej powierzchni, a następnie ostrożnie zdjąć folię uszczelniającą.
- Jeśli nie określono inaczej, kroki można wykonać przy płytce na magnesie lub poza nim.

Transfery płytek

- Podczas przenoszenia objętości pomiędzy płytkami należy przenieść określoną objętość z każdego dołka na płytce źródła do odpowiedniego dołka na płytce docelowej.

Korytko

- Korytka na odczynniki mogą być używane tam, gdzie jest to wskazane. Należy stosować się do następujących wytycznych:
 - Przygotować korytko za pomocą CB po wymieszaniu na wytrząsarce typu wortex. Nie ma potrzeby zawracania CB do próbki i wymieszania na wytrząsarce typu wortex przed drugim etapem dodawania kulek.
 - Należy oznaczyć TWB2 i RSB korytka, aby uniknąć nieporozumień.
 - Odczynniki należy utylizować, gdy jest to wskazane lub po zakończeniu pracy.
- Używać zalecanej objętości. Zalecane objętości obejmują 1 ml nadwyżki dla minimalnej objętości martwej korytka.
- RSB i TWB2 są pakowane w podobne próbki. Przed użyciem należy uważnie przeczytać każdą etykietę.

Wirowanie

- Odwirować wyłącznie we wskazanych krokach procedury, aby skonsolidować płyn lub kulki na dnie studzienki, aby zapobiec utracie próbek.

Postępowanie z kulkami

- Nie zamrażać Cleanup Beads (CB).
- Podczas płukania kulek:
 - Do wszystkich płytek MIDI należy stosować statyw magnetyczny zgodny z 96-dołkowymi płytkami.
 - Dozować płyn, aby żadne kulki nie przylegały do boku studzienki.
 - Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym.
- Zawsze dodawać odczynniki do środka lub dna studzienki bez podrywania kulek. Nie dodawać odczynników do górnej części dołka.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- Powoli pipetować zawieszony kulek.
- Wymieszać kulki na wytrząsarce typu worteks, aż zostaną dobrze rozproszone. Kolor płynu musi być jednorodny. Wymieszać na wytrząsarce typu worteks, jeśli określono w protokole, aby zapewnić ponowne zawieszenie kulek w momencie użycia.
- Jeśli nie można ponownie zawiesić kulek, potrząsnąć ponownie.
- Jeśli kulki zostaną zassane do końcówek pipety, jeśli to nie było planowane, należy wypchnąć je z powrotem na płytkę stojącą na stojaku magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się klarowna (ok. 2 minuty).
- Przechowywać w pozycji pionowej, aby upewnić się, że kulki są zanurzone w buforze podczas powrotu do przechowywania po użyciu.

Kontrole

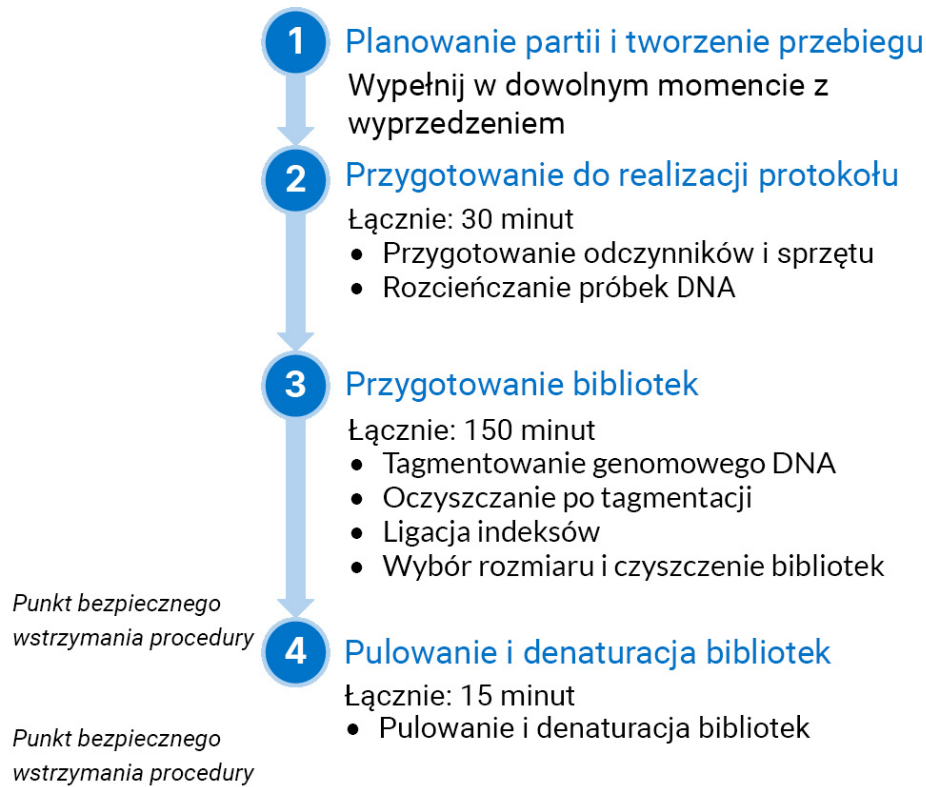
TruSight Whole Genome wykorzystuje kontrole analityczne wbudowane w oprogramowanie TruSight Whole Genome Analysis Application do kwalifikacji danych i nie wymaga użycia zewnętrznych kontroli partii. Więcej informacji na temat specyfikacji metrycznych można znaleźć w punkcie [Kontrole jakości na stronie 35](#).

Instrukcja użytkowania

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Procedura

Poniższy schemat ilustruje przebieg procedury TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Punkty bezpiecznego wstrzymania procedury są wskazane pomiędzy etapami.

W przypadku zatrzymania należy przywrócić pozostałe odczynniki w oryginalnych probówkach do temperatury przechowywania wskazanej w części [Dostarczone odczynniki na stronie 6](#). W przypadku kontynuowania należy przejść do następnego punktu protokołu dotyczącego przygotowania odczynników.



Planowanie partii i tworzenie przebiegu

Zaplanować liczbę bibliotek próbek dla partii oraz indeksowanie i pulowanie w celu sekwencjonowania.

Test TruSight Whole Genome został oceniony i zademonstrowano wydajność dla czterech zestawów indeksów dla komory przepływu S2 ([Rysunek 1, Tabela 4](#)) i dwóch zestawów indeksów dla komory przepływu S4 ([Rysunek 2, Tabela 5](#)). Oprogramowanie wymusza użycie określonych zestawów indeksów. Nie mieszać i nie dopasowywać pomiędzy określonymi zestawami indeksów.

Seqwencjonowanie krotności poza tymi zaleceniami nie jest obsługiwane.

Zestawy indeksów S2 i S4 obsługują wielkości partii przygotowania biblioteki 6, 12, 16, 18, 22 i 24 próbek. Użyć zgodnych zestawów indeksów wymienionych w [Tabela 3](#) dla każdego rozmiaru partii przygotowania biblioteki.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®



PRZESTROGA

Ułożyć próbki w płytce w orientacji odpowiadającej planowanemu indeksowaniu, tj. wiersze od A do H dla 16-krotności lub wiersze od A do F dla 6-krotności. Dodawać indeksy za pomocą pipety wielokanałowej, aby uniknąć pominięcia dołka lub dodania dwóch zestawów indeksów do pojedynczej próbki, co może spowodować, że nie będzie można uzyskać wyników ani uzyskać fałszywych wyników.

Tabela 3 Opcje zestawu indeksów dla partii przygotowania biblioteki

| Rozmiar partii przygotowanej biblioteki | Zestaw poddawany ocenie | Konfiguracje komory przepływowej |
|---|---|----------------------------------|
| 6 próbek | Zestaw indeksów S2 1, 2, 3 lub 4 (wybrać dowolny 1 zestaw) | S2 x 1 |
| 12 próbek | Zestaw indeksów S2 1, 2, 3 lub 4 (wybrać dowolne 2 zestawy) | S2 x 2 |
| 18 próbek | Zestaw indeksów S2 1, 2, 3 lub 4 (wybrać dowolne 3 zestawy) | S2 x 3 |
| 24 próbki | Zestaw indeksów S2 1, 2, 3 i 4 | S2 x 4 |
| 16 próbek | Zestaw indeksów S4 1 lub 2 | S4 x 1 |
| 22 próbki | Zestaw indeksów S4 1 + zestaw indeksów S2 3 lub 4 | S4 x 1 i S2 x 1 |
| | Zestaw indeksów S4 2 + zestaw indeksów S2 1 lub 2 | |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Rysunek 1 Układ płytki indeksującej przedstawiający cztery zestawy indeksów do sekwencjonowania komórek przepływowych S2

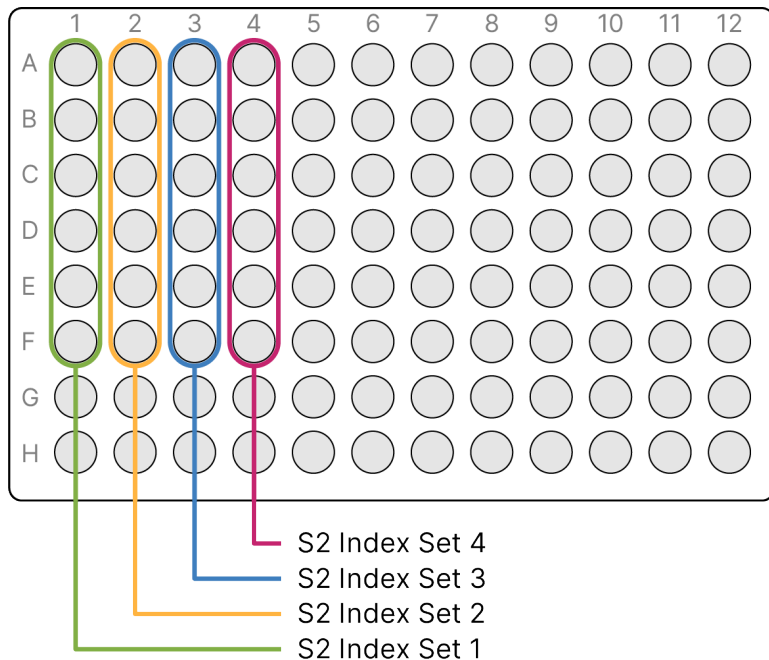


Tabela 4 Zestawy indeksów S2 dla komórek przepływowych S2

| | Zestaw indeksów S2 1 (zielony) | Zestaw indeksów S2 2 (żółty) | Zestaw indeksów S2 3 (niebieski) | Zestaw indeksów S2 4 (ciemno różowy) |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| A | UDP0037 | UDP0065 | UDP0081 | UDP0089 |
| B | UDP0038 | UDP0066 | UDP0082 | UDP0090 |
| C | UDP0039 | UDP0067 | UDP0083 | UDP0091 |
| D | UDP0040 | UDP0068 | UDP0084 | UDP0092 |
| E | UDP0041 | UDP0069 | UDP0085 | UDP0093 |
| F | UDP0042 | UDP0070 | UDP0086 | UDP0094 |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Rysunek 2 Układ płytki indeksującej przedstawiający dwa zestawy indeksów do sekwencjonowania komórek przepływowych S4

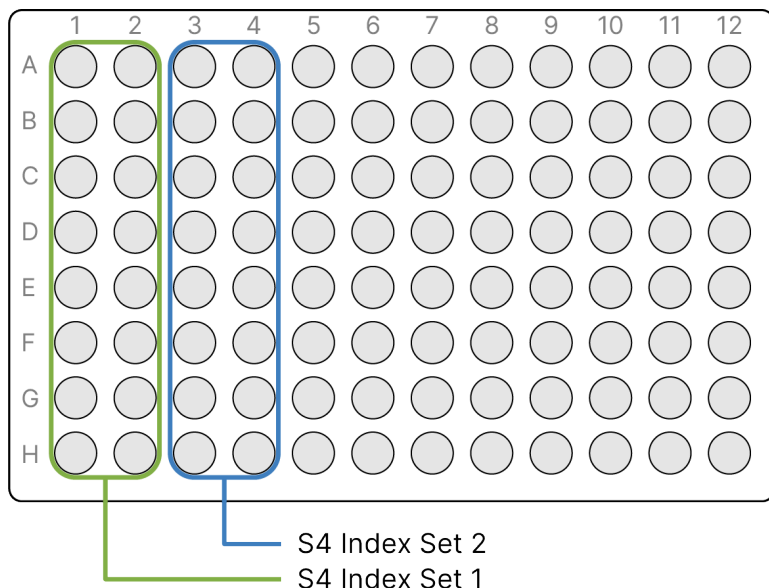


Tabela 5 Zbiory indeksów S4 dla komórki przepływowej S4

| | Zestaw indeksów S4 1 (zielony) | | Zestaw indeksów S4 2 (niebieski) | |
|----------|--------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| A | UDP0037 | UDP0065 | UDP0081 | UDP0089 |
| B | UDP0038 | UDP0066 | UDP0082 | UDP0090 |
| C | UDP0039 | UDP0067 | UDP0083 | UDP0091 |
| D | UDP0040 | UDP0068 | UDP0084 | UDP0092 |
| E | UDP0041 | UDP0069 | UDP0085 | UDP0093 |
| F | UDP0042 | UDP0070 | UDP0086 | UDP0094 |
| G | UDP0043 | UDP0071 | UDP0087 | UDP0095 |
| H | UDP0044 | UDP0072 | UDP0088 | UDP0096 |

Zapisać niepowtarzalną nazwę partii i dane próbki, w tym identyfikator próbki, powiązany identyfikator studzienki płytki indeksującej (patrz [Załącznik A na stronie 89](#)), płytkę biblioteki, identyfikator studzienki płytki biblioteki i identyfikator próbki biblioteki (jeśli jest znany). Informacje te są wprowadzane podczas tworzenia przebiegu.

W celu uzyskania instrukcji dotyczących funkcji Create Runs (Tworzenie przebiegów) przy użyciu aplikacji patrz TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931). Zapisać Run Name (Nazwę przebiegu), która zostać być użyta podczas ładowania materiałów eksploatacyjnych.



PRZESTROGA

Upewnić się, że indeksy i powiązane próbki używane podczas przygotowywania biblioteki odpowiadają indeksom zarejestrowanym i używanym do tworzenia przebiegu. Rozbieżności mogą spowodować zgłoszenie nieprawidłowych wyników lub ich brak.

Przygotowanie do protokołu

Przygotowanie odczynników i sprzętu

Jeśli planowane jest sekwencjonowanie tego samego dnia, należy wcześniej rozmrozić materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania. Szczegółowe instrukcje znajdują się w Dokumentacja NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105).

1. Podgrzać inkubator mikropróbek z wkładką do płytek MIDI do temperatury 47°C.
2. Wyjąć następujące odczynniki z pudełka i rozmrozić w następujący sposób.

Tabela 6 Przechowywanie od -25°C do -15°C

| Odczynnik | Nazwa pola | Instrukcje dotyczące rozmrażania |
|------------|---|---|
| BLT-PF | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1 | Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut. |
| ELM | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1 | Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie trzymać na lodzie do czasu, aż będzie to konieczne. |
| HP3 | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1 | Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut. |
| TB1 | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1 | Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut. |
| Indeksy UD | TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes | Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut. |

Tabela 7 Przechowywanie od 15°C do 30°C

| Odczynnik | Nazwa pola | Instrukcje dotyczące rozmrażania |
|-----------|---|----------------------------------|
| CB | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2 | Używać w temperaturze pokojowej. |
| RSB | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2 | Używać w temperaturze pokojowej. |
| ST2 | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2 | Używać w temperaturze pokojowej. |
| TWB2 | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2 | Używać w temperaturze pokojowej. |
| NB | TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2 | Używać w temperaturze pokojowej. |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®



PRZESTROGA

Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i pozbywać się ich zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

Przygotowanie próbek DNA

Należy przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

- Próbki gDNA oznaczone ilościowo:
 - a. Doprowadzić do temperatury pokojowej.
 - b. Krótco odwirować, aby zebrać kropelki.
 - c. Wymieszać za pomocą pulsacyjnej wytrząsarki typu worteks lub pipetować, a następnie krótco odwirować.
- RSB – Wytrząsać pulsacyjnie lub odwrócić w celu wymieszania. Przechowywać w temperaturze pokojowej.
 - RSB i TWB2 są pakowane w podobne probówki. Przed użyciem należy uważnie przeczytać każdą etykietę.

Procedura

W zależności od ilości wejściowej DNA, które różni się w zależności od zastosowanej metody oznaczania ilościowego DNA, należy obliczyć objętości wymagane do przygotowania rozcieńczonych próbek DNA. Poniżej przedstawiono równania dla trzech badanych metod oznaczania ilościowego DNA. Więcej informacji można znaleźć w [Zalecenia dotyczące wejściowej ilości DNA na stronie 11](#) i w [Załącznik B na stronie 92](#).

Obliczenia zakładają minimalną objętość pipetowania wynoszącą 2,0 µl i uwzględniają 10% nadwyżki. Zaokrąglenie należy wykonać w ostatnich krokach, po zakończeniu obliczeń, używając wymaganej liczby miejsc po przecinku, aby zapewnić dokładne pipetowanie.

Opcja 1: Ilość wejściowa DNA 280 ng dla metod kwantyfikacji szerokiego zakresu Quant i Qubit

Minimalne stężenie podstawowego roztworu DNA w próbce wynosi 11,2 ng/µl. Próbki < 11,2 ng/µl są bardziej narażone na niespełnianie wymagań kontroli jakości biblioteki po sekwencjonowaniu. W zależności od stężenia podstawowego roztworu DNA, do wykonywania obliczeń należy użyć jednego z poniższych równań.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

1. Dla stężenia podstawowego roztworu DNA od 11,2 do 154,0 ng/μl należy obliczyć objętość podstawowego roztworu DNA i wymagany RSB, używając całkowitej objętości rozcieńczonego DNA 27,5 μl (25 μl plus 10% nadwyżki) jako stałej:

- a. Obliczyć objętość podstawowego roztworu DNA:

$$\begin{aligned} \text{Objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Ilość wejściowa docelowego DNA (ng)} + 10\% \text{ nadwyżki})}{\text{Stężenie podstawowego roztworu DNA (ng/}\mu\text{l})} \\ &= 280 \text{ ng} \times 1,1 / \text{Stężenie podstawowego roztworu DNA (ng/}\mu\text{l}) \\ &= 308 \text{ ng} / \text{Stężenie podstawowego roztworu DNA (ng/}\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Obliczyć objętość podstawowego roztworu RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objętość RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Całkowita objętość rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) - \text{obliczona objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{obliczona objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Zweryfikować obliczenia: Potwierdzić obliczoną objętość podstawowego roztworu DNA (μl) + obliczoną objętość RSB (μl) = 27,5 μl, całkowitą objętość rozcieńczonego DNA (stała, 25 μl plus 10% nadmiaru).

2. Alternatywnie, dla stężeń podstawowego roztworu DNA > 154,0 ng/μl, obliczyć całkowitą potrzebną objętość rozcieńczonego DNA i RSB przy użyciu objętości podstawowego roztworu DNA 2,0 μl i docelowe rozcieńczone stężenie podstawowego roztworu DNA 11,2 ng/μl jako stałe.

- a. Obliczyć całkowitą objętość rozcieńczonego DNA:

$$\begin{aligned} \text{Całkowita objętość rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{stężenie podstawowego roztworu DNA (ng/}\mu\text{l}) \times \text{objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l})}{\text{Docelowe rozcieńczone stężenie podstawowego roztworu DNA}} \\ &= \text{stężenie podstawowego roztworu DNA (ng/}\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

- b. Obliczyć objętość RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objętość RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Obliczona całkowita objętość rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) - \text{Objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Obliczona całkowita objętość rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Zweryfikować obliczenia: potwierdzić obliczoną całkowitą objętość rozcieńczonego DNA (μl) – obliczoną objętość RSB (μl) = 2,0 μl, objętość podstawowego roztworu DNA (stała).

Przejdź do etapu 3 poniżej.

Opcja 2: Wejściowa ilość DNA 350 ng dla Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method

Minimalne stężenie podstawowego roztworu DNA w próbce wynosi 14,0 ng/μl. Próbkę < 14,0 ng/μl są bardziej narażone na niespełnianie wymagań kontroli jakości biblioteki po sekwencjonowaniu. W zależności od stężenia podstawowego roztworu DNA, do wykonywania obliczeń należy użyć jednego z poniższych równań.

1. Dla stężenia podstawowego roztworu DNA od 14,0 do 192,5 ng/μl obliczyć objętość podstawowego roztworu DNA i RSB potrzebną, używając całkowitej objętości rozcieńczonego DNA 27,5 μl (25 μl plus 10% nadwyżki) jako stałej:

- a. Obliczyć objętość podstawowego roztworu DNA:

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

$$\begin{aligned} \text{Objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Ilość wejściowa docelowego DNA } (ng) + 10\% \text{ nadwyżki})}{\text{Stężenie podstawowego roztworu DNA } (ng/\mu\text{l})} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1,1 / \text{Stężenie podstawowego roztworu DNA } (ng/\mu\text{l}) \\ &= 385 \text{ ng} / \text{Stężenie podstawowego roztworu DNA } (ng/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Obliczyć objętość podstawowego roztworu RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objętość RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Całkowita objętość rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) - \text{obliczona objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{obliczona objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Zweryfikować obliczenia: Potwierdzić obliczoną objętość podstawowego roztworu DNA (μl) + obliczoną objętość RSB (μl) = 27,5 μl , całkowitą objętość rozcieńczonego DNA (stała, 25 μl plus 10% nadmiaru).
2. Alternatywnie, w przypadku stężeń podstawowego roztworu DNA > 192,5 ng/ μl , obliczyć całkowitą potrzebną objętość rozcieńczonego DNA i RSB, używając objętości podstawowego roztworu DNA 2,0 μl jako stałej.
- a. Obliczyć całkowitą objętość rozcieńczonego DNA:

$$\text{Całkowita objętość rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) = \text{stężenie podstawowego roztworu DNA } (ng/\mu\text{l}) \times \frac{2,0 \mu\text{l}}{14,0 ng/\mu\text{l}}$$

- b. Obliczyć objętość RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objętość RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Objętość całkowita rozcieńczonego DNA } (\mu\text{l}) - \text{Objętość podstawowego roztworu DNA } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Objętość całkowita } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Zweryfikować obliczenia: potwierdzić obliczoną całkowitą objętość rozcieńczonego DNA (μl) – obliczoną objętość RSB (μl) = 2,0 μl , objętość podstawowego roztworu DNA (stała).
3. Dla każdej rozcieńczonej próbki oznaczyć nową probówkę do mikrowirówki o pojemności 0,5 ml.
4. Dodać objętość RSB obliczoną powyżej do odpowiedniej probówki dla każdej rozcieńczonej próbki.
5. Dodać objętość DNA obliczoną powyżej do odpowiedniej probówki dla każdej rozcieńczonej próbki.
6. Wymieszać pulsacyjnie na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.

Przygotowanie bibliotek

Aby przygotować odczynniki z wyprzedzeniem, należy wykonać czynności przygotowania opisane w tym punkcie.

O ile nie wyszczególniono punktu bezpiecznego przerwania oznaczenia, należy przejść do następnego etapu.

Przygotowanie

Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – wymieszać na wytrząsarce typu wortex. W przypadku stosowania wielu probówek wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie połączyć.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- a. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs.
- b. Krótco odwirować.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Sprawdzić pod kątem precypitacji. W przypadku zaobserwowania osadów, ogrzewać w temperaturze 37°C przez 10 minut, a następnie wymieszać na wytrząsarce typu wortexs aż do rozpuszczenia osadów.
 - b. Wymieszać dokładnie na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótco odwirować.
- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Odwrócić, aby wymieszać. Nie wytrząsać na wytrząsarce typu wortexs.
 - b. Przechowywać na lodzie do czasu użycia.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótco odwirować.
 - b. Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótco odwirować.
 - b. Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs przez 1 minutę.
 - b. Odwrócić 2–5 razy, a następnie dokładnie wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, aby ponownie uzyskać zawiesinę.
- Adaptery indeksowane (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótco odwirować.
 - b. Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Oznaczyć korek probówki TWB2.
 - b. Dokładnie odwrócić w celu wymieszania.
- W probówce do mikrowirówki oznaczonej symbolem 0,2N NaOH połączyć następujące objętości w celu przygotowania 0,2N NaOH zgodnie z planowaną wielkością partii. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs.

UWAGA W przypadku planowania pulowania i denaturacji bibliotek tego samego dnia należy przygotować dodatkowe 0,2N NaOH. Patrz [Przygotowanie na stronie 32](#).

| Odczynnik | 6 próbek (µl) | 12 próbek (µl) | 16 próbek (µl) | 18 próbek (µl) | 22 próbki (µl) | 24 próbki (µl) |
|-----------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| HP3 | 30 | 60 | 80 | 90 | 110 | 120 |
| RSB | 270 | 540 | 720 | 810 | 990 | 1080 |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- W probówce stożkowej o pojemności 15 ml połączyć następujące objętości, aby przygotować 80% EtOH zgodnie z planowaną wielkością partii. Uwzględniono nadwyżkę przy użyciu korytka. Wymieszać na wytrząsarce typu wortexs.

| Odczynnik | 6 próbek (ml) | 12 próbek (ml) | 16 próbek (ml) | 18 próbek (ml) | 22 próbki (ml) | 24 próbki (ml) |
|--------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 100% etanol, czysty, absolutny | 4 | 8 | 8 | 12 | 12 | 12 |
| Woda bez nukleaz | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |



PRZESTROGA

Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednio do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i pozbywać się ich zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi.

Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

Tagmentowanie genomowego DNA

Ten etap wykorzystuje Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) do tagmentowania DNA. W ramach tego procesu następuje fragmentacja i znakowanie DNA sekwencjami adapterów.

Materiały eksploatacyjne

- 96-dołkowe płytki MIDI
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Procedura

1. Sprawdzić, czy inkubator mikropróbek z płytką MIDI został wstępnie nagrany do temperatury 47°C.
2. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako LP1 (Płytkę biblioteki 1).
3. Wyznaczyć i zapisać identyfikatory dołków na próbki do oznaczania rozcieńczonych próbek DNA i odczynników.
4. Przenieść 25 µl rozcieńczonego DNA próbki do każdego dołka.
5. Dodać 10 µl TB1 do każdego dołka.
6. BLT-PF Energicznie wymieszać na wytrząsarce typu wortex przez 1 minutę, aby ponownie uzyskać zawiesinę. Nie wirować. W razie potrzeby powtórzyć.
7. Dodać 15 µl BLT-PF do każdego dołka.
8. Zafoliować i wytrząsać LP1 z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
9. Inkubować LP1 we wstępnie podgrzanym inkubatorze do mikropróbek w temperaturze 47°C przez 8 minut.

UWAGA Oczekuje się, że na uszczelce płytki powstanie niewielkie skroplenie. Nie wirować.

10. Zdjąć uszczelkę i dodać 10 µl ST2 do każdego z dołków.
11. Uszczelnić i potrząsać LP1 przy 1800 obr./min przez 1 minutę, a następnie przejść do następnego kroku.

Oczyszczanie po tagmentacji

Poniższe etapy mają na celu usunięcie niezwiązanego DNA i wymianę buforu, aby przygotować próbki do następnego kroku.

Materiały eksploatacyjne

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Korytko

Informacje o odczynnikach

- Powoli pipetować TWB2 aby zminimalizować powstawanie piany.
- RSB i TWB2 są pakowane w podobne probówki. Przed użyciem należy uważnie przeczytać każdą etykietę.

Procedura

1. Zdjąć folię i umieścić płytkę LP1 na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
2. Przygotować TWB2 korytko z objętościami zgodnie z poniższą tabelą i wyraźnie oznaczyć korytko TWB2. Objętości uwzględniają 1 ml nadwyżki dla minimalnej martwej objętości korytka. Zachować korytko do późniejszych etapów.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Odczynnik | 6 próbek (µl) | 12 próbek (µl) | 16 próbek (µl) | 18 próbek (µl) | 22 próbki (µl) | 24 próbki (µl) |
|-----------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| TWB2 | 3700 | 6400 | 8200 | 9100 | 10900 | 11800 |

3. Pozostawić LP1 na statywie magnetycznym i za pomocą pipety wielokanałowej ustawionej na 60 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania kulek.
4. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 150 µl TWB2 do każdego dołka.
5. Zafoliować i wytrząsać LP1 z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
6. Zdjąć folię i umieścić płytkę LP1 na podstawie magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
7. W trakcie inkubacji należy powrócić do przechowywania zamrożonego BLT-PF, a następnie przejść do następnego etapu.

Ligacja indeksów

W tym punkcie użytkownicy ligują unikalne adaptory podwójnego indeksu do każdej próbki zgodnie z indeksowaniem zaplanowanym podczas [Planowanie partii i tworzenie przebiegu na stronie 17](#).

Materiały eksploatacyjne

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Adaptory indeksowane (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) korytko
- 0,2N NaOH (Rozcieńczanie HP3)

Informacje o odczynnikach

- Dołków płytki wskaźnikowej nie można ponownie używać.
- Nabierać i dozować ELM powoli ze względu na lepkość roztworu.
- RSB i TWB2 są pakowane w podobne probówki. Przed użyciem należy uważnie przeczytać każdą etykietę.

Procedura

1. Trzymać LP1 na stojaku magnetycznym i wykonać następujące czynności:
 - a. Za pomocą pipety wielokanałowej ustawionej na 150 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdej studzienki.
 - b. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 20 µl usunąć i odrzucić resztę TWB2 z każdego dołka.
 - c. Dodać 45 µl ELM do każdego dołka.
 - d. Przekłuć uszczelkę foliową na płycie adaptera wskaźnika dla każdego planowanego dołka indeksującego za pomocą pipety wielokanałowej P200 i nowych końcówek pipety. Aby uniknąć zanieczyszczenia, do każdego dołka należy używać nowej końcówki pipety.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- e. Dodać adaptery 5 µl do odpowiednich dołków próbek LP1 zgodnie z indeksami wybranymi podczas planowania partii przy użyciu pipety wielokanałowej P-10 lub P-20.
2. Zafoliować i wytrząsać LP1 z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
3. Inkubować LP1 we wstępnie podgrzany inkubatorze do mikropórek w temperaturze 47°C przez 8 minut.

UWAGA Oczekuje się, że na uszczelce płytki powstanie niewielkie skroplenie. Nie wirować.

4. W trakcie inkubacji należy ponownie umieścić ELM w zamrożonym miejscu przechowywania.
5. Zdjąć folię i umieścić płytkę LP1 na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
6. Pozostawić płytkę LP1 na statywie magnetycznym i za pomocą pipety wielokanałowej ustawionej na objętość 50 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.
7. Przemywać kulki w następujący sposób.
 - a. Dodać 150 µl TWB2 do każdej studzienki za pomocą pipety wielokanałowej.
 - b. Zafoliować i wytrząsać LP1 z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
 - c. Zdjąć folię i umieścić płytkę LP1 na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
 - d. Pozostawić płytkę LP1 na statywie magnetycznym i za pomocą pipety wielokanałowej ustawionej na objętość 150 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.
8. Przemyć kulki po raz **drugi**.
9. Gdy LP1 znajduje się na stojaku magnetycznym, użyć pipety wielokanałowej ustawionej na 20 µl, aby usunąć i wyrzucić pozostałości TWB2 z każdej studzienki bez naruszania kulek.
10. Do 0,2N NaOH każdego dołka dodać 45 µl wcześniej przygotowanego roztworu.
11. Uszczelnić i wstrząsać LP1 przy 1800 obr./min przez 1 minutę, a następnie przejść do następnego punktu.

Wybór rozmiaru i czyszczenie bibliotek

Ten krok wykorzystuje dwustronne wybieranie rozmiaru bibliotek. W pierwszym kroku Cleanup Beads są dodawane do wymywanych bibliotek i kuleczek BLT-PF. Następnie nadsącz zawierający poddaną elucji bibliotekę jednoniciową jest przenoszony na nową płytkę, podczas gdy zbyt duże fragmenty pozostają. W drugim kroku Cleanup Beads są dodawane do przeniesionych bibliotek, a zbyt małe fragmenty są usuwane. Następnie biblioteki poddaje się elucji i przenosi na końcową płytę biblioteki (FLP).

Materiały eksploatacyjne

- 96-dołkowe płytki MIDI
- Korytka (3)
- Płytki PCR
- CB (Cleanup Beads)

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- RSB (Resuspension Buffer)
- Świeżo przygotowany 80% roztwór etanolu (80% EtOH)

Przygotowanie

1. Wymieszać CB za pomocą wytrząsarki typu wortex aż do całkowitego ponownego zawieszenia.
2. Przygotować korytko CB z objętościami zgodnie z poniższą tabelą i oznaczyć korytko CB. Objętości są wystarczające dla obu etapów dodawania i obejmują 1 ml nadwyżki w korytku dla minimalnej martwej objętości. Nie ma potrzeby mieszania pomiędzy kolejnymi etapami dodawania CB. Kulki pozostaną rozproszone w trakcie procedury.

| Odczynnik | 6 próbek (µl) | 12 próbek (µl) | 16 próbek (µl) | 18 próbek (µl) | 22 próbki (µl) | 24 próbki (µl) |
|-----------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| CB | 1480 | 1960 | 2280 | 2440 | 2760 | 2920 |

Procedura

1. Zdjąć uszczelkę i dodać 40 µl CB do dołków płytki LP1 MIDI zawierających BLT-PF i 0,2N NaOH.
2. Zafoliować i wytrząsać LP1 z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
3. Inkubować LP1 poza stojakiem magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
4. Usunąć folię i umieścić LP1 na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 5 minut).
5. Podczas inkubacji płytki należy oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI LP2.
6. *Przenieść* 80 µl nadsącza z LP1 na stojaku magnetycznym do odpowiednich dołków LP2 za pomocą pipety wielokanałowej.
7. Dodać 40 µl CB do każdej studzienki płytki LP2 MIDI.
8. Zafoliować i wytrząsać LP2 z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
9. Wyrzucić płytkę LP1 MIDI.
10. Inkubować LP2 poza stojakiem magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
11. Usunąć folię i umieścić LP2 na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 5 minut).
12. Pozostawić płytkę LP2 na statywie magnetycznym i za pomocą pipety wielokanałowej ustawionej na objętość 120 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.
13. Wlać wcześniej przygotowany roztwór 80% EtOH do oznaczonego korytka i przemyć kulki LP2 na magnesie w następujący sposób.
 - a. Dodać 180 µl 80% EtOH za pomocą pipety wielokanałowej.
 - b. Odczekać 30 sekund.
 - c. Za pomocą pipety ustawionej na objętość 180 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- Przemyć kulki po raz **drugi**.
- Gdy LP2 znajduje się na stojaku magnetycznym, użyć pipety wielokanałowej ustawionej na 20 µl, aby usunąć i wyrzucić pozostałości EtOH z każdej studzienki bez naruszania kulek.
- Trzymać LP2 na powietrzu na stojaku magnetycznym przez 4 minut, aby wysuszyć.
- Wyrzucić nieużyty roztwór 80% EtOH i korytka.
- Przygotować korytka RSB z objętościami zgodnie z poniższą tabelą i oznaczyć pojemnik RSB. Objętości uwzględniają 1 ml nadwyżki dla minimalnej martwej objętości korytka.

| Odczynnik | 6 próbek (µl) | 12 próbek (µl) | 16 próbek (µl) | 18 próbek (µl) | 22 próbki (µl) | 24 próbki (µl) |
|-----------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| RSB | 1390 | 1780 | 2040 | 2170 | 2430 | 2560 |

- Dodać 65 µl RSB do kuleczek w każdym dołku.
- Zafoliować i wytrząsać LP2 z prędkością 1800obr./min przez 1 minutę.
- Inkubować LP2 w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
- Zdjąć folię i umieścić LP2 na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
- Oznaczyć nową płytkę PCR FLP (ostateczna płytka biblioteki) i nazwą partii używaną podczas tworzenia testu.
- Przenieść* 60 µl nadsącza z LP2 na stojaku magnetycznym do odpowiednich dołków FLP za pomocą pipety wielokanałowej.



PRZESTROGA

Nadsącz zawiera ostateczną bibliotekę i będzie używany podczas etapu połączenia i denaturacji. Nie wyrzucać.

- Wyrzucić wszystkie korytka wraz z niewykorzystanymi odczynnikami w korytkach.
- Wyrzucić płytkę LP2 MIDI.

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku zatrzymania należy zamknąć końcową płytkę biblioteki (FLP) mikrouszczelką B i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 14 dni.

Pulowanie i denaturacja bibliotek

W tym punkcie użytkownicy tworzą pule zaplanowane w części [Planowanie partii i tworzenie przebiegu na stronie 17](#) oraz rozcieńczają i denaturują.

Materiały eksploatacyjne

- HP3 (2N NaOH) lub 0,2N NaOH jeśli przygotowano tego samego dnia – wymieszać za pomocą wytrząsarki typu wortex, a następnie krótko odwirować.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- NB (Neutralization Buffer) – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
- RSB (Resuspension Buffer) – wymieszać na wytrząsarce typu wortex lub odwrócić w celu wymieszania.
- Probówki do mikrowirówek (1 do przygotowania odczynnika i 1 do każdej planowanej biblioteki)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 lub PN 20062291) (1 probówka na każde planowane połączenie bibliotek)

Przygotowanie

1. Połączyć podane poniżej objętości w probówce do mikrowirówki, aby przygotować 0,2N NaOH. Oznaczyć probówkę 0,2N NaOH. Jeśli podczas przygotowywania biblioteki przygotowano dodatkowy 0,2N NaOH, a protokół został wykonany tego samego dnia, należy pominąć ten krok.

Aby zapobiec niewielkim błędom w pipetowaniu, przygotowywana jest dodatkowa objętość.

| Odczynnik | Objętość dla każdej komory przepływowej S2 (µl) | Objętość dla każdej komory przepływowej S4 (µl) |
|-----------|---|---|
| HP3 | 5 | 10 |
| RSB | 45 | 90 |

2. Wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.

Procedura

1. Jeśli płytką FLP była przechowywana zamrożona, należy ją przygotować w sposób opisany poniżej. W przeciwnym razie należy przejść do etapu 2.

Płytką FLP:

- a. Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - b. Odwirować z przyspieszeniem 1000 × g przez 1 minutę.
 - c. Zdjąć uszczelkę z FLP.
 - d. Za pomocą pipety wielokanałowej ustawionej na 30 µl, przepipetować każdą próbkę od 5 do 10 razy, aby wymieszać.
 - e. Uszczelnić i odwirować z przyspieszeniem 1000 × g przez 1 minutę.
2. Wybrać jedną z poniższych opcji, aby złączyć w pulę, denaturować i rozcieńczyć biblioteki dla każdego zestawu 6 lub 16 próbek planowanych do sekwencjonowania.
Opcja 1 Sekwenowanie 6 bibliotek w komórce przepływu S2.
 - a. Dla puli bibliotek oznaczyć nową probówkę do mikrowirówki nazwą puli, na przykład pulowane biblioteki (PB) 1, 2, 3 itd.
 - b. Usunąć uszczelkę i przenieść 25 µl każdej biblioteki DNA oznaczonej kodem kreskowym z danego zbioru indeksów S2 z płytki FLP do probówki PB dla każdego odpowiedniego planowanego przebiegu zgodnie z pulami do sekwencjonowania zaplanowanymi podczas [Planowanie partii i tworzenie przebiegu na stronie 17](#). Można na przykład połączyć biblioteki przygotowane przy użyciu zbioru indeksów S2 1 w probówkę PB.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- c. Na płytkę oznaczoną FLP nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i odłożyć do miejsca przechowywania.
- d. Dodać 37 µl 0,2N NaOH do każdej probówki PL.
- e. Wymieszać na wytrząsarce typu wortex każdą probówkę PB. Krótco odwirować.
- f. Inkubować każdą probówkę PB w temperaturze pokojowej przez 8 minut.
- g. Dodać 38 µl NB do każdej probówki PB.
- h. Wymieszać na wytrząsarce typu wortex każdą probówkę PB. Krótco odwirować.
- i. Przenieść 225 µl denaturowanej, rozcieńczonej biblioteki do czystej probówki Library NovaSeq 6000Dx.



PRZESTROGA

Jeśli wcześniej wybrano tę opcję, do identyfikacji i powiązania planowanego przebiegu zostanie użyty identyfikator probówki Library NovaSeq 6000Dx. Upewnić się, że identyfikator probówki Library, do której została przeniesiona pula, jest tym samym identyfikatorem probówki Library określonym w opcji Create Run (Utwórz przebieg). W przeciwnym razie może wystąpić nieprawidłowe powiązanie wyników próbki. Jeśli w planowanym przebiegu określono identyfikator probówki Library, należy potwierdzić, że używana jest prawidłowa probówka. Jeśli wcześniej nie określono inaczej, należy zarejestrować użyty identyfikator probówki Library i skorygować planowany przebieg. W przeciwnym razie podczas ładowania urządzenia przy użyciu nazwy przebiegu konieczne będzie ręczne wybranie powiązanego zaplanowanego przebiegu (lub zaplanowanych przebiegów).

Opcja 2 Sekwenowanie 16 bibliotek w komórce przepływu S4.

- a. Oznaczyć nową probówkę do mikrowirówki nazwą puli, na przykład pulowane biblioteki (PB) 1, 2, 3 itd.
- b. Usunąć folię i przenieść 18 µl każdej biblioteki DNA z płytki FLP do probówki PB zgodnie z pulą sekwencjonowania zaplanowaną podczas [Planowanie partii i tworzenie przebiegu na stronie 17](#). Można na przykład połączyć biblioteki przy użyciu zbioru indeksów S4 1 w probówkę PB.
- c. Na płytkę oznaczoną FLP nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i odłożyć do miejsca przechowywania.
- d. Dodać 22 µl RSB do każdej probówki PB.
- e. Dodać 77 µl 0,2N NaOH do każdej probówki PB.
- f. Probówkę PB wymieszać na wytrząsarce typu wortex. Krótco odwirować.
- g. Inkubować probówkę PB w temperaturze pokojowej przez 8 minut.
- h. Dodać 78 µl buforu NB do probówki PB.
- i. Probówkę PB wymieszać na wytrząsarce typu wortex. Krótco odwirować.
- j. Przenieść 465 µl denaturowanej, rozcieńczonej biblioteki do czystej probówki Library NovaSeq 6000Dx.



PRZESTROGA

Jeśli wcześniej wybrano tę opcję, do identyfikacji i powiązania planowanego przebiegu zostanie użyty identyfikator próbówki Library NovaSeq 6000Dx. Upewnić się, że identyfikator próbówki Library, do której została przeniesiona pula, jest tym samym identyfikatorem próbówki Library określonym w opcji Create Run (Utwórz przebieg). W przeciwnym razie może wystąpić nieprawidłowe powiązanie wyników próbki. Jeśli w planowanym przebiegu określono identyfikator próbówki Library, należy potwierdzić, że używana jest prawidłowa próbówka. Jeśli wcześniej nie określono inaczej, należy zarejestrować użyty identyfikator próbówki Library i skorygować planowany przebieg. W przeciwnym razie podczas ładowania urządzenia przy użyciu nazwy przebiegu konieczne będzie ręczne wybranie powiązanego zaplanowanego przebiegu (lub zaplanowanych przebiegów).

- Przejsć bezpośrednio do sekwencjonowania, jeśli planowane jest rozpoczęcie przebiegu tego samego dnia.

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku przerwania procedury, próbówkę Library NovaSeq 6000Dx należy zamknąć korkiem i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 30 dni.

Przygotowanie do sekwencjonowania

- Postępować zgodnie z instrukcjami przygotowania podanymi w Dokumentacja NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105) dla materiałów eksploatacyjnych zestawu planowanych do sekwencjonowania.
- Jeśli próbówka NovaSeq 6000Dx Library zawierająca zbiorczą bibliotekę była przechowywana w stanie zamrożonym, należy przygotować ją w następujący sposób. W przypadku przejścia bezpośrednio z poprzedniej sekcji, przejdź do 3.
 - Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - Zdjąć zatyczkę i delikatnie wymieszać pipetą pięć razy za pomocą pipety P1000 ustawionej na 300 µl dla połączenia biblioteki komórek przepływu S4 lub pipety P200 ustawionej na 145 µl dla połączenia biblioteki komórek przepływu S2.
 - Zakryć próbówkę Library NovaSeq 6000Dx korkiem i ręcznie potrząsnąć kroplami na dnie. Nie wytrząsać ani nie wirować.
- Ładowanie materiałów eksploatacyjnych. Szczegółowe informacje można znaleźć w Dokumentacja NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105).

Interpretacja wyników

TruSight Whole Genome jest przeznaczony do sekwencjonowania całego ludzkiego genomu. Warianty są raportowane dla próbek, które spełniają wymagania analitycznych kontroli jakości (QC) do stosowania w dalszych zastosowaniach analizy linii zarodkowej.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

- Wynik sekwencjonowania, FASTQ lub jakości próbki uznaje się za ważny tylko wtedy, gdy pomiar jakości spełnia lub przekracza zdefiniowaną specyfikację. Jeśli wskaźnik jakości jest poniżej zdefiniowanej specyfikacji, wydajność zostanie zgłoszona jako NIEPOWODZENIE i należy powtórzyć próbkę. Informacje na temat specyfikacji pomiaru jakości stosowanych do określenia ważności próbki można znaleźć w punkcie [Kontrola jakości na stronie 35](#).
- Oczekuje się, że próbki, które spełniają wymagania wszystkich progów jakości, zapewnią wykonanie rozpoznania wariantowego opisanego w badaniu dokładności (patrz [Dokładność na stronie 47](#)).
- Małe warianty są oznaczone wysokim, pośrednim lub niskim poziomem ufności na podstawie oczekiwanych wyników każdego typu wariantu (patrz [Ustalenie poziomu ufności dla małych wariantów na stronie 43](#)).
- Interpretacja wszystkich informacji o wariacie musi zostać zweryfikowana przez laboratorium przy użyciu dostarczonych plików wyników analizy. Opis informacji zawartych w plikach wyników znajduje się w TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931).

Kontrole jakości

Ważność przebiegu sekwencjonowania i próbki jest określana automatycznie za pomocą kontroli analitycznych i jest zgłaszana przez TruSight Whole Genome Analysis Application (patrz [Tabela 8](#), aby uzyskać dodatkowe informacje na temat specyfikacji parametrów kontroli jakości). TruSight Whole Genome nie wymaga stosowania zewnętrznych kontroli dodatknych.

- Wyniki kontroli jakości są raportowane w skonsolidowanym raporcie, dla wszystkich próbek w przebiegu oraz w raportach kontroli jakości poszczególnych próbek. Raporty są generowane przez oprogramowanie do folderu analizy. Patrz lokalizacja katalogu analizy TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931) oraz katalogu przebiegu.
- Niepowodzenie specyfikacji kontroli jakości przebiegu sekwencjonowania unieważnia przebieg sekwencjonowania i zatrzymuje dodatkową analizę.
- Niepowodzenie analizy jakiegokolwiek próbki FASTQ lub specyfikacji biblioteki unieważnia bibliotekę próbek i uniemożliwia wynik powiązanych plików CRAM lub VCF.
- Dodatkowe czynności wymagane w związku z kontrolą jakości mogą obowiązywać zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi oraz warunkami akredytacji.

Więcej informacji na temat powtarzania przebiegu sekwencjonowania lub testów bibliotek zawiera punkt [Rozwiązywanie problemów na stronie 72](#).

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Tabela 8 TruSight Whole Genome Opisy specyfikacji wskaźników kontroli jakości

| | Metryka | Specyfikacja | Opis |
|---|--------------------------|--------------------------|--|
| Kontrola jakości przebiegu sekwencjonowania | Łącznie % \geq Q30 | \geq 85 | Pomiar podstawowej jakości na poziomie przebiegu. Ustawiono minimalne wymagania specyfikacji, ponieważ przebiegi ze zbyt niskim %Q30 nie spełniają wymagań Q30 nukleotydów w kontroli jakości biblioteki próbek. |
| QC FASTQ | Wydajność na próbkę (pz) | \geq 90 000 000 000 | Minimalne ustawienie jest równoważne ~26-krotnemu średniemu pokryciu autosomalnemu w celu sklasyfikowania próbek, które nie spełnią wymagań kontroli jakości biblioteki, aby skrócić czas analizy. |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| | Metryka | Specyfikacja | Opis |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------|--|
| Kontrola jakości biblioteki próbek | Średnie pokrycie autosomalne | ≥ 35 | Średnie pokrycie autosomów. Ustalono minimalną specyfikację, aby zapewnić wydajność analityczną. |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Metryka | Specyfikacja | Opis |
|--|-------------------------|--|
| Odsetek autosomów z pokryciem przekraczającym 20x | $\geq 93,94$ | Pomiar jednolitości pokrycia, który wykrywa problemy niezwiązane z obciążeniem GC. Ustalono minimalną specyfikację, aby zapewnić wydajność analityczną. |
| Znormalizowane pokrycie dla kategorii GC od 60% do 79% | $0,82 \leq x \leq 1,13$ | Pomiar jednolitości pokrycia, który rozpoznaje obciążenia GC, w szczególności utratę pokrycia w obszarach genomu o zawartości nukleotydów z większą zawartością % GC i niższą zawartością % AT. Minimalne i maksymalne specyfikacje są ustawiane w celu zapewnienia wydajności analitycznej. |
| Znormalizowane pokrycie kategorii GC od 20% do 39% | $0,97 \leq x \leq 1,06$ | Pomiar jednolitości pokrycia, który rozpoznaje obciążenia GC, w szczególności utratę pokrycia w obszarach genomu o zawartości nukleotydów z niższą zawartością % GC i wyższą zawartością % AT. Minimalne i maksymalne specyfikacje są ustawiane w celu zapewnienia wydajności analitycznej. |
| Średnie pokrycie mitochondrialne | ≥ 500 | Pokrycie chromosomu mitochondrialnego. Minimalna specyfikacja jest ustawiona w celu zapewnienia granicy wykrywalności mitochondrialnego SNV. |
| Odsetek nukleotydów Q30 | ≥ 85 | Pomiar jakości nukleotydów. Ustalono minimalną specyfikację, aby zapewnić wydajność analityczną. |
| Szacowane zanieczyszczenie próbki | $\leq 0,005$ | Wykrywa odczyty stanowiące zanieczyszczenie z innych próbek. Maksymalna specyfikacja jest ustawiana w celu zapewnienia granicy wykrywalności mitochondrialnej SNV (typ wariantu o najwyższej czułości na zanieczyszczenie). |

Charakterystyka wydajności

Następujące badania walidacyjne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem procedury pracy TruSight Whole Genome opisanej w [Instrukcja użytkowania na stronie 17](#) i zostały zaprojektowane w celu zapewnienia odporności testu na typowe źródła zmienności oraz w celu zapewnienia zaleceń dotyczących spójnej wydajności. W badaniach tych wykorzystano analityczne specyfikacje parametrów QC przedstawione w [Tabela 8](#) jako punkt odniesienia dla pomyślnej wydajności oznaczenia oraz jako warunek wstępny do ustalenia wydajności analitycznego rozpoznania wariantów.

Zanieczyszczenie krzyżowe

W badaniu dotyczącym zanieczyszczenia krzyżowego oceniano nieprawidłowe wykrywanie odczytu indeksowego ze względu na skażenie od studzienki do studzienki podczas przygotowywania biblioteki próbek i skażenie od przebiegu do przebiegu pomiędzy kolejnymi przebiegami sekwencjonowania. Do oceny zanieczyszczenia krzyżowego wykorzystano 24 próbki krwi. Łącznie 24 biblioteki zostały przygotowane przez dwóch operatorów przy użyciu zestawów indeksów do konfiguracji S2 1–4, a połączone biblioteki były sekwencjonowane w kolejności indeksu ustawionego w jednym NovaSeq 6000Dx Instrument. Każda z 16 bibliotek została przygotowana przez dwóch operatorów przy użyciu zestawów indeksów konfiguracji S4 1 i 2 w dwóch powtórzeniach, a połączone biblioteki z naprzemiennymi zestawami indeksów były sekwencjonowane w tym samym NovaSeq 6000Dx.

W celu oceny zanieczyszczenia krzyżowego porównano prawidłowe odczyty wskaźnika z sąsiednich studzienek pod kątem zanieczyszczenia od studzienki do studzienki i wcześniejsze sekwencjonowanie pod kątem zanieczyszczenia pomiędzy kolejnymi przebiegami. Ilość zanieczyszczeń pomiędzy przebiegami wynosiła $\leq 0,003178\%$ dla przebiegu S2 i $\leq 0,002487\%$ dla przebiegu S4. Do oceny zanieczyszczenia od próbki do próbki wykorzystano wskaźnik kontroli jakości biblioteki próbek dla szacowanego zanieczyszczenia próbki. Ilość zanieczyszczeń pomiędzy próbkami wyniosła 0,001, co stanowi najniższą wartość zgłaszaną przez oprogramowanie do analizy. Wyniki te wskazują, że istnieje małe ryzyko zanieczyszczenia podczas procesów przygotowania biblioteki i sekwencjonowania.

Stabilność użytkowa i pośrednia

Odczynniki do przygotowywania biblioteki zostały ocenione pod kątem stabilności podczas stosowania zestawu, w tym wielu zdarzeń zamrażania i rozmrażania oraz stabilności otwartych próbek.

W przypadku testów cyklu zamrażania i rozmrażania zamrożone elementy zostały poddane pięciu testom zamrażania i rozmrażania, aby obsłużyć jedno zdarzenie rozpakowywania i cztery zdarzenia związane z użyciem zestawu. W celu zapewnienia stabilności podczas użytkowania objętość wymagana do przygotowania sześciu bibliotek próbek została usunięta podczas każdego z trzech cykli zamrażania i rozmrażania w celu symulacji zmniejszenia objętości podczas użytkowania, a składniki były przechowywane przez dodatkowe 31 dni przed badaniem. Po badaniu z użyciem gDNA wyizolowanego od sześciu dawców krwi wszystkie dane

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

odpowiadały analitycznym parametrom kontrolnym testu. Wyniki te wskazują, że zamrożone odczynniki do przygotowywania biblioteki mogą być używane z maksymalnie czterema cyklami zamrażania i rozmrażania oraz 30-dniową stabilnością podczas użytkowania.

Stabilność pośrednia została oceniona dla poszczególnych bibliotek oraz bibliotek połączonych i denaturowanych. Wszystkie dane odpowiadały analitycznym parametrom kontroli oznaczenia wskazując na stabilność do 14 dni dla poszczególnych bibliotek i stabilność do 30 dni dla bibliotek zbiorczych i denaturowanych w przypadku przechowywania w stanie zamrożonym (-25°C do -15°C) zgodnie z opisem w bezpiecznych punktach zatrzymania.

Pobieranie i przechowywanie próbek krwi

Zgodność próbek do pobierania krwi i przechowywanie próbek badano przy użyciu czterech dawców i krwi pobieranej do próbek do pobierania próbek z EDTA od trzech różnych dostawców. Genomowy DNA (gDNA) został wyizolowany z każdej próbki po otrzymaniu w celu uzyskania czasu zerowego, a następnie ponownie po przechowywaniu krwi przez 16, 33 i 43 dni w temperaturze od 2°C do 8°C. Wyizolowany gDNA przechowywano w stanie zamrożonym (-25°C do -15°C) w elution buffer (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0), a następnie oznaczono ilościowo i wykorzystano do przygotowania biblioteki i sekwencjonowania. Wszystkie dane odpowiadały parametrom kontroli analitycznej testu wskazując na zgodność testu z trzema różnymi próbkami do pobierania krwi z EDTA i krwią przechowywaną do pięciu tygodni w temperaturze od 2°C do 8°C.

Ocena metody izolacji DNA

Pod kątem wydajności testu oceniono trzy dostępne na rynku zestawy do izolacji. Dwa zestawy z kulkami magnetycznymi, jeden zawierający i jeden niezawierający fazy stałej i wiązania na bazie celulozy, i jeden zestaw z metodą oczyszczania kwasu nukleinowego na bazie krzemionki przy użyciu kolumn typu spin ([Tabela 9](#)).

Ocenę wykonało dwóch operatorów z jedną partią odczynników do izolacji na metodę i krwią pełną pobieraną do próbek z EDTA od czterech domniemanych zdrowych dawców. Każdą próbkę krwi wyizolowano cztery razy, zgodnie z instrukcjami producenta, w nienastępujących po sobie dniach, łącznie 16 obserwacji na zestaw. Wyizolowany gDNA został użyty do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania i analizy.

Wszystkie obserwacje (16/16) dla każdej metody izolacji odpowiadały parametrom kontroli analitycznej oznaczenia. Wybór metody izolacji gDNA nie wpływał na działanie testu. W badaniach dokładności analitycznej i odtwarzalności wykorzystano gDNA wyizolowany z zestawu 3 (izolacja kolumny filtra krzemionkowego z kolumnami typu spin).

Tabela 9 Metody izolacji przetestowane pod kątem wydajności TruSight Whole Genome

| Zestaw | Metoda izolacji |
|--------|--|
| 1 | Izolacja przy użyciu kulek magnetycznych z odwracalnym unieruchomieniem fazy stałej (SPRI) |

| Zestaw | Metoda izolacji |
|--------|---|
| 2 | Izolacja przy użyciu kulek magnetycznych z ruchomą fazą stałą i wiązaniem na bazie celulozy |
| 3 | Izolacja przy użyciu kolumny filtra krzemionkowego z kolumnami typu spin |

Czułość na poziom wejściowy DNA

Ilość wejściowa gDNA zalecana do badania na próbkę wynosi 280 ng lub 350 ng w zależności od metod oznaczania ilościowego DNA wymienionych w [Zalecenia dotyczące wejściowej ilości DNA na stronie 11](#).

W celu określenia wydajności w zakresie stężeń wejściowych gDNA, ilość DNA użytego w teście była testowana na poziomach mieszczących się w zakresie $\pm 28,6\%$ zalecanego wejściowego poziomu. Wyniki wykazały, że -25% zalecanego wejściowego gDNA stanowi dolną granicę dla oznaczenia. Oznaczenie działa prawidłowo z ilością wejściową gDNA do $+28,6\%$ zalecanej ilości wejściowej.

Charakterystyka trzech różnych metod oznaczania ilościowego wykazała, że różne metody mają różne poziomy zmienności i mogą dawać różne wyniki. W przypadku stosowania metody innej niż wymieniona w [Zalecenia dotyczące wejściowej ilości DNA na stronie 11](#), docelowe wejściowe gDNA może wymagać optymalizacji. Zaleca się, aby gDNA dla próbek przeznaczonych do określonej partii przygotowanej biblioteki i przebiegu sekwencjonowania były oznaczane ilościowo razem w celu wyeliminowania zmienności między partiami, gdy jest to możliwe, lub aby zastosowano kontrole procesu w celu zapewnienia $\leq 25\%$ zmienności ilościowej pomiędzy partiami w gDNA.

Substancje zakłócające

W tym badaniu oceniano skuteczność działania zarówno substancji endogennych, jak i egzogennych związanych z krwią ludzką i próbkami do pobierania krwi. Do oceny wybrano odpowiednio bilirubinę, hemoglobinę i trójglicerydy w celu symulacji próbek żółtaczkowych, hemolizowanych i lipemicznych. Biotyna i EDTA zostały wybrane do oceny ze względu na obecność w próbkach do pobierania krwi (BCT) i potencjalny wpływ na skład chemiczny testu. Substancje były dodawane do próbek krwi dawcy przed izolacją bezpośrednio lub po rozpuszczeniu w rozpuszczalniku. Stężenie testowe i szczegółowe informacje dotyczące dodawania dla każdej substancji podano w poniższej tabeli.

Tabela 10 Substancje zakłócające przetestowane pod kątem działania TruSight Whole Genome

| Substancja | Stężenie testowane | Rozpuszczalnik stosowany w roztworze substancji dodawanej | % substancji dodanej do krwi |
|--------------------------|------------------------------------|---|---------------------------------|
| Bilirubina (niesprężona) | 40 mg/dL (0,4 mg/ml) ¹ | DMSO | 4% |
| Hemoglobina | 1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹ | Nie dot. – rozpuszczone we krwi | Nie dot. – rozpuszczone we krwi |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Substancja | Stężenie testowane | Rozpuszczalnik stosowany w roztworze substancji dodawanej | % substancji dodanej do krwi |
|---------------|------------------------------------|---|------------------------------|
| Trójglicerydy | 1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹ | 100% etanol | 4% |
| Biotyna | 0,00351 mg/ml ² | Woda | 4% |
| EDTA | 5,4 mg/ml ³ | Woda | 3% |

¹ Stężenia zostały wybrane jako najwyższe obserwowane stężenia zgodnie z „Tabelami uzupełniającymi do badań zakłóceń w chemii klinicznej, CLSI EP37-ED1:2018”.

² Stężenie zostało wybrane jako trzykrotnie wyższe niż „Najwyższe stężenie leku w trakcie leczenia terapeutycznego” podane w „Tabelach dodatkowych do badań zakłóceń w chemii klinicznej, CLSI EP37-ED1:2018”.

³ Stężenie zostało wybrane na podstawie stężenia EDTA, które różni się w próbkach do pobierania krwi w zakresie do 1,8 mg/ml i w celu symulacji zdarzenia krótkiego napełnienia próbki krwi o 33% większej niż nominalna objętość BCT, co prowadzi do 3x wyższego stężenia EDTA we krwi odpowiadającego 5,4 mg/ml.

Do badania wykorzystano krew od czterech dawców. W przypadku każdej substancji zakłócającej dodawano ją do porcji krwi pełnej od każdego dawcy, a następnie podzielono ją na cztery powtórzenia izolacji gDNA.

Kontrola była przetwarzana podobnie jak próbka bez dodawania substancji. Połączone warunki testu i kontroli były przetwarzane dla każdego dawcy w ramach tej samej izolacji, a wyizolowany gDNA było następnie przetwarzany w ramach jednego przygotowania biblioteki i sekwencjonowania. Nie miało to wpływu na wydajność testu ani na brak dowodów na zakłócenia w odpowiedzi na którąkolwiek z badanych substancji.

Równoważność indeksowania próbek

TruSight Whole Genome zapewnia wybór czterech zestawów indeksów 6-pleksowych dla przebiegów S2 lub dwóch zestawów indeksów 16-pleksowych dla konfiguracji przebiegu sekwencjonowania S4. Wykazano, że test zapewnia równoważną wydajność, gdy biblioteki są sekwencjonowane w konfiguracjach przebiegu sekwencjonowania NovaSeq 6000Dx S2 lub S4. Ponadto zarówno konfiguracje przebiegu S2, jak i S4 wykazały osiągnięcie > 95% bibliotek próbek z pokryciem co najmniej 35,0x podczas badania z wykorzystaniem zalecanych zestawów indeksów. W związku z tym różne zestawy indeksów i łączenie stosowane do sekwencjonowania w komórkach przepływu S2 i S4 mogą być używane zamiennie, aby zapewnić skalowalność w celu dostosowania do wahań przepustowości próbek i zapewnienia elastyczności procesów laboratoryjnych.

Wyniki analityczne

Przeprowadzono wstępne badania charakterystyki w celu określenia progów poziomu ufności dla małych wariantów, granicy ślepej próby/granicy wykrywalności mitochondrialnych SNV oraz progów wielkości w celu dokładnego wykrywania rozszerzeń STR podczas korzystania z przepływu pracy TruSight Whole Genome. Próbkę reprezentującą klasy wariantów ocenione przez TruSight Whole Genome zostały uwzględnione w ocenie dokładności analitycznej i powtarzalności, w tym precyzji wewnątrzlaboratoryjnej i odtwarzalności zewnętrznej. Wydajność analityczna jest raportowana dla serii sekwencjonowania i próbek, które przeszły wszystkie kontrole

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

jakości, z wyjątkiem próbek sztucznych mieszanin używanych do oceny mitochondrialnych SNV przy granicy wykrywalności lub w jej pobliżu, która nie spełniła wymagań pod kątem zanieczyszczeń. Wyniki każdego z tych badań opisano w częściach poniżej.

Początkowe badania charakterystyki

Ustalenie poziomu ufności dla małych wariantów

W tym badaniu model regresji logistycznej został przeszkolony w zakresie wysoce powtarzalnych i słabo odtwarzalnych miejsc wariantów z 96 powtórzeń NA12878 w celu określenia progów dla poziomów wysokiego, średniego i niskiego poziomu ufności.

Nukleotydy wysokiego poziomu ufności dla danego typu wariantu to te, w których przewidywana odtwarzalność w obrębie laboratorium osiąga lub przekracza 99% dla danego progu wyniku, a procent nukleotydów innych niż N, które spełniają to kryterium, przekracza 30%. Jeśli mały typ wariantu nie ma progu wyniku spełniającego te kryteria, ten typ wariantu nie będzie mieć wysokiego poziomu pewności. Nukleotydy średniego poziomu ufności to te, w których przewidywana odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna osiąga lub przekracza 95% dla danego progu wyniku i typu wariantu. Nukleotydy niskiego poziomu ufności to te, w których przewidywana odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna wynosi poniżej 95% dla danego progu wyniku i typu wariantu. Rozpoznanie wariantów określonego typu z wysokim lub pośrednim poziomem ufności obejmują większość nukleotydów innych niż %N (tj. z wyłączeniem luk) (patrz Tabela 6) i wykazują wysoką wydajność, gdy ocenia się je w oparciu o zestawy prawdziwe z małym wariantem i w ramach szeroko zakrojonej oceny precyzji wewnątrzlaboratoryjnych powtórzeń NA12878.

| Typ wariantu | Poziom ufności | % nukleotydów innych niż N |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|
| SNV | Wysoki | 89,14% |
| | Średni | 3,30% |
| | Niski | 7,56% |
| Krótkie delecje (1–5 pz) | Wysoki | 90,88% |
| | Średni | 2,45% |
| | Niski | 6,67% |
| Delecje pośrednie (6-15 pz) | Średni | 86,94% |
| | Niski | 13,06% |
| Długie delecje (≥ 16 pz) | Średni | 85,42% |
| | Niski | 14,58% |
| Krótkie insercje (1-5 pz) | Wysoki | 88,94% |
| | Średni | 4,61% |
| | Niski | 6,45% |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Typ wariantu | Poziom ufności | % nukleotydów innych niż N |
|---------------------------------|----------------|----------------------------|
| Insercje pośrednie (6–15 pz) | Średni | 89,37% |
| | Niski | 10,63% |
| Długie insercje (≥ 16 pz) | Średni | 48,92% |
| | Niski | 50,63% |

Określenie granicy ślepej próby/granicy wykrywalności mitochondrialnych SNV

Przeprowadzono badania granicy ślepej próby (LoB) i granicy wykrywalności (LoD) dla mitochondrialnych SNV. W badaniu mitochondrialnych SNV oceniano LoB za pomocą loci, o których wiadomo, że nie mają żadnego wariantu (tj. rozpoznanie referencyjne). LoD jest definiowana jako częstość alleli wariantu mtDNA SNV, dla której odsetek wykrywania tego wariantu wynosi 95%.

Aby określić LoB i LoD do wykrywania heteroplazmowych mtSNV, starannie scharakteryzowane próbki gDNA od dwóch różnych dawców krwi zostały wymieszane w badaniu z miareczkowaniem do pięciu poziomów rozcieńczenia z 20 powtórzeniami na poziom rozcieńczenia. Poziomy rozcieńczenia zostały zaprojektowane w celu ukierunkowania na procenty wariantów mtSNV (1,2 - 6% VAF) i naśladowania różnych poziomów heteroplazmii mitochondrialnej. Przetworzono mieszane próbki gDNA, a odczyty zostały obniżone, aby uzyskać 500-krotne średnie pokrycie mitochondrialne. W dalszej ocenie wykorzystano łącznie 42 miejsca objęte „heteroplazmią”. Analiza regresji została wykorzystana do oszacowania wymaganych proporcji mieszania do docelowego 1x LoD i 2x LoD dla podzbioru mtSNV.

Pozycje, w których gDNA z obu próbek krwi zawiera referencyjne genotypy alleli, oceniono pod kątem rozpoznań mtSNV, które przeszły filtr z allelem innym niż odniesienie. Wskaźnik wyników fałszywie dodatnich obliczono jako 0,8%, zgodnie z założeniem zero-LoB zgodnie z „Oceną możliwości wykrywania dla klinicznych procedur laboratoryjnych, CLSI EP17-A2-ED1:2012”. Każda z 42 pozycji była analizowana niezależnie przy użyciu regresji probitowej. Wartość LoD została zdefiniowana jako oczekiwana wartość VAF odpowiadająca 95% (C95) odsetka wykrywania. Ogólna zgłoszona wartość LoD, zdefiniowana jako 95. percentyl wartości LoD z prawdziwych miejsc, wynosiła 4,75% VAF. Średnia rozkładu różnic bezwzględnych pomiędzy obserwowanymi i oczekiwanymi VAF dla wszystkich obserwacji została obliczona jako 0,83% z górną 95% granicą ufności 0,86% VAF.

Określenie progu ekspansji STR

Ze względu na ograniczenia techniczne w zakresie STR, które przekraczają długość odczytu sekwencjonowania (~135 pz), obserwowana długość STR w przypadku TruSight Whole Genome często będzie niedoszacowaniem rzeczywistej długości. Gdy rzeczywista długość STR przekroczy średnią długość fragmentu (~330 pz), szacowana długość STR będzie równa płaszczyznom. Z tego powodu TruSight Whole Genome ocenia docelowy zestaw loci, dla którego test może dokładnie rozróżnić STR o zaobserwowanych długościach w granicach normy od tych o długościach większych niż obserwowane w domniemaniu zdrowej populacji („ekspansja”) (Tabela 2 lista loci oceniana przez TruSight Whole Genome).

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Aby zapewnić łączną zgodność procentową wyników ujemnych (NPA) na poziomie 95% we wszystkich miejscach STR ocenianych przez TruSight Whole Genome, progi dla poszczególnych lokalizacji w celu rozpoznania rozszerzonego STR w tym miejscu zostały ustawione na osiągnięcie średniej NPA na poziomie 99,94% dla danego miejsca. Aby uwzględnić naturalną zmienność w szacunkach wielkości STR w domniemaniu zdrowej populacji, progi zostały ustalone na podstawie rozkładu niezależnie obserwowanych długości STR w zestawie danych domniemania zdrowych projektów genomów 1000 (2504 próbki z różnych populacji przetworzonych z użyciem DRAGEN 3,7,5 i ExpansionHunter 4.0.2).⁴

Aby potwierdzić progi ustalone przy użyciu zestawu danych projektu 1000 genomów, wyizolowany gDNA z 16 referencyjnych próbek linii komórkowej (program materiałów referencyjnych badań genetycznych (Get-RM) Centrum Kontroli Chorób) z różnymi niezależnie szacowanymi rozmiarami STR, przetwarzano przy użyciu TruSight Whole Genome. 10 powtórzeń biblioteki dla każdej z 16 próbek przygotowano i przetestowano przez sześciu operatorów, łącznie 960 obserwacji, a rozmiary STR zostały niezależnie oszacowane dla każdego powtórzenia. Zaobserwowany poziom fałszywie dodatni dla wszystkich docelowych loci wynosił 0,35%.

Granica wykrywalności (LoD) została oszacowana dla 28 docelowych loci STR z liniami komórkowymi przetestowanymi na podstawie wielkości alleli obserwowanych przy TruSight Whole Genome i oczekiwanych wielkości alleli na podstawie wcześniejszej niezależnej charakterystyki (Tabela 11). Dla wybranych loci określono granicę wykrywalności dla więcej niż jednego STR w tym samym miejscu, łącznie 35 STR. LoD to szacunkowy rozmiar, przy którym oczekiwana ekspansja STR jest wykrywana dla 95% alleli na podstawie modelu probitowego z potwierdzonymi progami w celu rozróżnienia normalnych i rozszerzonych rozmiarów STR. Dane ze wszystkich miejsc o znanych rozmiarach alleli zostały połączone w celu uzyskania szacunkowych wartości LoD dla każdego miejsca na podstawie progu specyficznego dla danego miejsca dla rozszerzonego STR. Długość powtórzenia FMR1 była systematycznie zaniżona w porównaniu z innymi STR i wymagała modelu niestandardowego do prawidłowej oceny LoD.

Potwierdzone progi specyficzne dla danego miejsca dla rozszerzonych STR, szacunkowe przewidywane i obserwowane LoD dla miejsc docelowych oraz próg choroby na podstawie dostępnej literatury (tylko w celach ilustracyjnych) dla docelowych STR podano w Tabeli 11. W przypadku ekspansji STR dłuższych niż próg określony przez długość odczytu, dla których nie można bezpośrednio zaobserwować oczekiwanej długości, obserwowana długość jest przybliżona do średniej długości, która byłaby obserwowana podczas kilku przebiegów sekwencjonowania. W przypadku ekspansji STR krótszych niż próg określony przez długość odczytu, oczekiwana i obserwowana długość są takie same.

Tabela 11 Podsumowanie szacunkowych możliwości wykrywania dla TruSight Whole Genome docelowych miejsc STR

| Docelowe locusa ^a | Wartość progowa ekspansji STR (pz) na podstawie zestawu danych projektu obejmującego 1000 genomów | Szacowana LoD (oczekiwana długość, pz) | Szacowana LoD (długość zaobserwowana, pz) | Wartość progowa choroby (prawdziwa długość, pz) ^b |
|------------------------------|---|--|---|--|
| AFF2 | 168 | 266 | 221 | 600 ⁵ |
| AR | 114 | 115 | 115 | 114 ⁶ |
| ATN1 | 90 | 92 | 92 | 135 ^{7,8} |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Docelowe locusa ^a | Wartość progowa ekspansji STR (pz) na podstawie zestawu danych projektu obejmującego 1000 genomów | Szacowana LoD (oczekiwana długość, pz) | Szacowana LoD (długość zaobserwowana, pz) | Wartość progowa choroby (prawdziwa długość, pz) ^b |
|------------------------------|---|--|---|--|
| ATXN1 | 114 | 115 | 115 | 114 ^{7,8} |
| ATXN10 | 200 | 298 | 233 | 3995 ^{7,8} |
| ATXN2 | 102 | 102 | 102 | 105 ^{7,8} |
| ATXN3 | 135 | 189 | 182 | 180 ^{7,8} |
| ATXN7 | 60 | 60 | 60 | 111 ^{7,8} |
| ATXN7_GCC | 93 | 101 | 101 | Nd. |
| ATXN8OS | 200 | 298 | 233 | 237 ^{7,8} |
| ATXN8OS_CTA | 90 | 92 | 92 | Nd. |
| C9ORF72 ^c | 200 | 298 | 233 | 360 ^{9,10} |
| CACNA1A | 57 | 57 | 57 | 60 ^{7,8} |
| CBL | 171 | 281 | 227 | 243 ⁵ |
| CNpz | 192 | 308 | 237 | 300 ^{5,11} |
| CNpz_CA | 102 | 102 | 102 | Nd. |
| CNpz_CAGA | 68 | 80 | 80 | Nd. |
| CSTB | 200 | 298 | 233 | 348 ^{12,13} |
| DIP2B | 200 | 298 | 233 | Nd. |
| DMPK | 122 | 132 | 142 | 150 ¹⁴ |
| FMR1 | 175 | 433 | 212 | 600 ^{d,15} |
| FXN | 102 | 102 | 102 | 198 ^{6,16} |
| FXN_A | 200 | 298 | 233 | Nd. |
| GLS | 111 | 115 | 115 | 270 ¹⁷ |
| HTT | 108 | 115 | 115 | 120 ¹⁸ |
| HTT_CCG | 42 | 42 | 42 | Nd. |
| JPH3 | 99 | 101 | 101 | 123 ¹⁹ |
| NIPA1 | 33 | 33 | 33 | Nd. |
| NOP56 | 84 | 84 | 84 | 3900 ^{20,21} |
| NOP56_CGCCTG | 24 | 24 | 24 | Nd. |
| NOTCH2NL | 129 | 175 | 174 | 213 ^{22,23} |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Docelowe locusa ^a | Wartość progowa ekspansji STR (pz) na podstawie zestawu danych projektu obejmującego 1000 genomów | Szacowana LoD (oczekiwana długość, pz) | Szacowana LoD (długość zaobserwowana, pz) | Wartość progowa choroby (prawdziwa długość, pz) ^b |
|------------------------------|---|--|---|--|
| PAPzN1 | 27 | 27 | 27 | Nd. |
| PHOX2B | 60 | 60 | 60 | 75 ^{5,24} |
| PPP2R2B | 87 | 90 | 90 | 198 ^{7,8} |
| Tpz | 129 | 175 | 174 | 135 ^{7,8} |

^a Loci z alternatywnymi STR są oznaczone przez LOCL<ALTERNATE_REPEAT> (np. ATXN7_GCC).

^b Progi choroby podane wyłącznie do celów ilustracyjnych w oparciu o opublikowaną literaturę; Nie dot. (nie dotyczy) w tej kolumnie wskazuje, że STR może nie być związany z opublikowaną ekspansją chorobotwórczą.

^c 100% powtórzeń NA23378 wykryło ekspansję STR w C9ORF72, co sugeruje wcześniej niecharakteryzowaną ekspansję w tym miejscu w tej próbce. Ta próbka linii komórkowej została wykluczona z analizy.

^d Ekspansje pośrednie mogą być również związane z fenotypem.

To badanie wykazało podobne profile precyzji i dokładności dla szacunków wielkości STR w różnych docelowych lokalizacjach, przy czym granica wykrywalności dla ekspansji STR jest w dużej mierze oparta na wybranym progu (na podstawie rozkładu wielkości w populacji projektu 1000 genomów), a nie przez różnice w możliwości wykrywania w różnych ośrodkach. Wszystkie szacowane wartości LoD w oczekiwanej skali długości były większe niż długości obserwowane w domniemaniu zdrowych populacjach i niższe niż wiele opublikowanych progów choroby, co czyni powiązane progi rozpoznania ekspansji STR użytecznymi do oznaczenia powtórzenia w określonym locus jako potencjalnie rozszerzone. Progi podane tutaj zostały wykorzystane do oceny dokładności wykrywania ekspansji STR.

Dokładność

Dokładność analityczną określono przez porównanie rozpoznań TruSight Whole Genome wariantów z wynikami uzyskanymi za pomocą alternatywnych metod. Metody referencyjne zostały wybrane na podstawie znacznej różnicy w porównaniu z TruSight Whole Genome, która wykorzystuje przygotowanie biblioteki Nextera™ z ogniwiem kulkowym, mechanizm chemiczny sekwencjonowania z użyciem dwóch barwników w NovaSeq 6000Dx oraz DRAGEN 3.9.5 do rozpoznawania wariantów. Przeprowadzono reprezentatywne podejście do walidacji TruSight Whole Genome z próbkami reprezentującymi warianty we wszystkich klasach wariantów uwzględnionych w wynikach oznaczenia. Do oceny dokładności testu wykorzystano łącznie 459 unikalnych próbek spełniających wymagania kontroli jakości analizy TruSight Whole Genome. Próbkę zostały przetestowane w trzech partiach odczynników do przygotowywania biblioteki i materiałów eksploatacyjnych, czterech partiach zestawów sekwencjonujących S4, przez ośmiu operatorów, w pięciu NovaSeq 6000Dx Instrument i w dwóch wewnętrznych lokalizacjach. Przygotowano i zsekwencjonowano 31 niezależnych puli bibliotek.

Poniższa tabela zawiera definicje parametrów obliczanych w różnych badaniach.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Termin | Definicja |
|---|--|
| Niższy poziom ufności (LCL) | Jednostronna dolna granica ufności o 95% przy użyciu metody Wilsona. |
| Procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA) ¹ | Procent miejsc ujemnych zdefiniowany metodą referencyjną, które zgodnie z ustaleniami są identyfikowane jako ujemne za pomocą TruSight Whole Genome. |
| Procentowa zgodność wyników dodatnich (PPA) ² | Procent wariantów rozpoznanych metodą referencyjną, które są zgodne z TruSight Whole Genome. |
| Techniczna dodatnia wartość predykcyjna (TPPV) ³ | Procent rozpoznanych wariantów TruSight Whole Genome, które są zgodnie rozpoznane w metodzie referencyjnej. |

¹ Dla dokładności wykrywania ekspansji STR i dokładności wykrywania alleli SMN1, NPA = Prawdziwie ujemny / (Prawdziwie ujemny + Fałszywie dodatni).

² Dla dokładności wykrywania ekspansji STR i dokładności wykrywania alleli SMN1, PPA = Prawdziwie dodatni / (Prawdziwie dodatni + Fałszywie ujemny).

³ Dla dokładności wykrywania rozprężenia STR i dokładności wykrywania alleli SMN1 TPPV = Prawdziwie dodatni / (Prawdziwie dodatni + Fałszywie dodatni).

Dokładność małego wariantu

Dokładność rozpoznań o małym wariacie oceniano przy użyciu genomowego DNA wyizolowanego z krwi obwodowej pełnej 195 domniemanie zdrowych dawców. Rozpoznania TruSight Whole Genome wariantów porównywano z rozpoznaniem o wariantach z klinicznie zatwierdzonego testu sekwencjonowania całego genomu wykonanego w Laboratorium Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA jako metody referencyjnej. Metoda referencyjna sekwencjonowania całego genomu wykorzystuje przygotowanie biblioteki bez reakcji PCR TruSeq™ oparte na ligacji, chemię sekwencjonowania 4-barwnego w systemie sekwencjonowania HiSeq™ oraz DRAGEN 3.8.4 do rozpoznawania wariantów. W tym badaniu nie scharakteryzowano wstawiania i delecji o wielkości > 31 pz, ponieważ nie zostały one zweryfikowane w metodzie referencyjnej.

Podsumowanie dokładności dla wszystkich rozpoznań małych wariantów przedstawia [Tabela 12](#) i [Tabela 13](#).

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Tabela 12 Oznaczenie TruSight Whole Genome Dokładność dla małych wariantów ze stratyfikacją według poziomu i rozmiaru pewności (przeliczeniowo zdrowe próbki krwi)

| Podtyp wariantu | Poziom ufności | Rozpoznanienia zgodne z metodą referencyjną | Wyłączone rozpoznania w metodzie referencyjnej | Rozpoznanienia zgodnych rozpoznań | Wyłączone rozpoznania w oznaczeniu | PPA (LCL) | TPPV (LCL) |
|----------------------------|----------------|---|--|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|------------------|
| SNV | Wysoki | 261 728 580 | 1 573 877 | 261 603 149 | 208 639 | 99,4% (99,4%) | 99,9% (99,9%) |
| | Średni | 6 677 589 | 421 718 | 6 519 811 | 151 128 | 94,1% (94,0%) | 97,7% (97,7%) |
| | Niski | 6 864 840 | 3 251 709 | 6 649 756 | 2 151 388 | 67,9% (67,8%) | 75,6% (75,5%) |
| Krótka delecja (1-5 pz) | Wysoki | 11 978 745 | 201 783 | 12 246 922 | 67 277 | 98,3% (98,3%) | 99,5% (99,5%) |
| | Średni | 2 875 258 | 45 290 | 3 050 170 | 47 593 | 98,4% (98,4%) | 98,5% (98,5%) |
| | Niski | 1 802 544 | 228 582 | 1 966 974 | 221 449 | 88,7% (88,7%) | 89,9% (89,8%) |
| Średnia delecja (6-15 pz) | Średni | 858 673 | 20 079 | 860 493 | 18 361 | 97,7% (97,7%) | 97,9% (97,9%) |
| | Niski | 145 618 | 28 300 | 157 398 | 41 824 | 83,7% (83,6%) | 79,0% (78,9%) |
| Długa delecja (16-31 pz) | Średni | 344 168 | 14 334 | 336 976 | 31 165 | 96,0% (95,9%) | 91,5% (91,5%) |
| | Niski | 54 444 | 23 438 | 53 835 | 47 272 | 69,9% (69,6%) | 53,2% (53,0%) |
| Krótka insercja (1-5 pz) | Wysoki | 11 212 366 | 164 651 | 11 380 307 | 49 776 | 98,6% (98,5%) | 99,6% (99,6%) |
| | Średni | 1 015 324 | 41 890 | 988 512 | 36 051 | 96,0% (96,0%) | 96,5% (96,5%) |
| | Niski | 639 663 | 198 700 | 576 797 | 180 458 | 76,3% (76,2%) | 76,2% (76,1%) |
| Średnia insercja (6-15 pz) | Średni | 790 968 | 18 163 | 798 572 | 17 111 | 97,8% (97,7%) | 97,9% (97,9%) |
| | Niski | 76 105 | 24 188 | 88 389 | 35 819 | 75,9% (75,7%) | 71,2% (71,0%) |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Podtyp wariantu | Poziom ufności | Rozpoznania zgodne z metodą referencyjną | Wyłączone rozpoznania w metodzie referencyjnej | Rozpoznania zgodnych rozpoznań | Wyłączone rozpoznania w oznaczeniu | PPA (LCL) | TPPV (LCL) |
|---------------------------|----------------|--|--|--------------------------------|------------------------------------|------------------|------------------|
| Długa insercja (16-31 pz) | Średni | 159 927 | 3 135 | 159 432 | 8 639 | 98,1% (98,0%) | 94,9% (94,8%) |
| | Niski | 102 552 | 22 199 | 103 892 | 55 724 | 82,2% (82,0%) | 65,1% (64,9%) |

Tabela 13 Podsumowanie TruSight Whole Genome NPA rozpoznań małych wariantów ze stratyfikacją według poziomu ufności

| Poziom ufności | Zgodne rozpoznania ujemne | Metoda referencyjna Wyłączone ujemne rozpoznania | NPA (LCL) |
|----------------|---------------------------|---|---------------|
| Wysoki | 202 276 243 790 | 127 465 816 | 99,9% (99,9%) |
| Średni | 3 307 740 675 | 77 650 177 | 97,7% (97,7%) |
| Niski | 3 653 569 580 | 439 038 662 | 89,3% (89,3%) |

Przeprowadzono dodatkowe badanie dokładności w celu oceny wykrywania małych wariantów z dostępnymi na rynku próbkami DNA linii komórek odniesienia (Coriell Institute for Medical Research) z dobrze scharakteryzowanymi zestawami rozpoznań wygenerowanymi przez Konsorcjum Genome in a Bottle (GIAB). W tym badaniu jako metody referencyjnej wykorzystano zestawy rozpoznań GIAB. Zestaw z rzeczywistą liczbą wariantów w tych próbkach obejmuje insercje i delecje większe niż 31 pz, więc w tej ocenie uwzględniono większe insercje i delecje. Próbkę te obejmowały HG001-005 i NA24695 z wynikami przedstawionymi łącznie w [Tabela 14](#).

Tabela 14 Oznaczenie TruSight Whole Genome Dokładność dla małych wariantów ze stratyfikacją według poziomu ufności i rozmiaru (próbki ze scharakteryzowanymi liniami komórkowymi)

| Podtyp wariantu | Poziom ufności | Rozpoznania zgodności GIAB | Wyłączone rozpoznania GIAB | Rozpoznania zgodnych rozpoznań | Wyłączone rozpoznania w oznaczeniu | PPA (LCL) | TPPV (LCL) |
|-----------------|----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| SNV | Wysoki | 21 431 369 | 2 552 | 21 439 303 | 3 954 | >99,9% (>99,9%) | >99,9% (>99,9%) |
| | Średni | 908 172 | 1 259 | 910 058 | 2 175 | 99,9% (99,9%) | 99,8% (99,8%) |
| | Niski | 720 717 | 59 691 | 722 180 | 28 721 | 92,4% (92,3%) | 96,2% (96,1%) |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Podtyp wariantu | Poziom ufności | Rozpoznania zgodności GIAB | Wyłączone rozpoznania GIAB | Rozpoznania zgodnych rozpoznań | Wyłączone rozpoznania w oznaczeniu | PPA (LCL) | TPPV (LCL) |
|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Krótka delecja (1-5 pz) | Wysoki | 1 080 383 | 690 | 1 090 370 | 730 | 99,9% (99,9%) | 99,9% (99,9%) |
| | Średni | 423 547 | 788 | 437 019 | 606 | 99,8% (99,8%) | 99,9% (99,9%) |
| | Niski | 263 828 | 2 624 | 281 217 | 2 088 | 99,0% (99,0%) | 99,3% (99,2%) |
| Średnia delecja (6-15 pz) | Średni | 142 671 | 238 | 144 997 | 167 | 99,8% (99,8%) | 99,9% (99,9%) |
| | Niski | 86 174 | 812 | 91 710 | 546 | 99,1% (99,0%) | 99,4% (99,4%) |
| Długa delecja (≥ 16 pz) | Średni | 34 414 | 315 | 34 580 | 55 | 99,1% (99,0%) | 99,8% (99,8%) |
| | Niski | 9 985 | 393 | 10 212 | 106 | 96,2% (95,9%) | 99,0% (98,8%) |
| Krótka insercja (1-5 pz) | Wysoki | 927 288 | 221 | 925 787 | 271 | >99,9% (>99,9%) | >99,9% (>99,9%) |
| | Średni | 158 346 | 294 | 137 081 | 250 | 99,8% (99,8%) | 99,8% (99,8%) |
| | Niski | 93 857 | 2 402 | 75 687 | 1 427 | 97,5% (97,4%) | 98,1% (98,1%) |
| Średnia insercja (6-15 pz) | Średni | 91 117 | 116 | 89 054 | 60 | 99,9% (99,9%) | 99,9% (99,9%) |
| | Niski | 37 925 | 745 | 36 670 | 406 | 98,1% (98,0%) | 98,9% (98,8%) |
| Długa insercja (≥ 16 pz) | Średni | 11 081 | 46 | 11 110 | 17 | 99,6% (99,5%) | 99,8% (99,8%) |
| | Niski | 14 086 | 607 | 14 312 | 262 | 95,9% (95,6%) | 98,2% (98,0%) |

Dokładność wariantu liczby kopii

Dokładność rozpoznania CNV oceniano przy użyciu tej samej metody referencyjnej i próbek rzekomo zdrowych krwi dawców (195), które zostały wykorzystane do oceny dokładności rozpoznania małych wariantów. Każdy CNV jest uważany za wykryty w zestawie rozpoznań, jeśli co najmniej 50% tego CNV jest objęte rozpoznaniem CNV tego samego typu (UZYSK/STRATA) w dopasowanym zestawie rozpoznań. TruSight Whole Genome

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

definiuje zestaw regionów genomowych, które są wykluczone z rozpoznania CNV na podstawie oceny danych próbki z 1000 genomów i 77 rzekomo zdrowych dawców krwi przy użyciu parametrów związanych z odchyleniami głębokości pokrycia, odchyleniami od pokrycia i lukami w pokryciu w celu ustalenia obszarów genomu, które nie podlegają zgłoszeniu w przypadku CNV. Rozpoznania CNV oceniano tylko w regionach genomowych, które były wspólne zarówno dla metody referencyjnej, jak i TruSight Whole Genome.

Podsumowanie dokładności dla wszystkich rozpoznań CNV zostało przedstawione w [Tabela 15](#) i [Tabela 16](#).

Tabela 15 Oznaczenie TruSight Whole Genome Dokładność dla CNV ze stratyfikacją według rozmiaru i typu

| Rozmiar | Typ | Rozpoznania zgodne z metodą referencyjną | Wyłączone rozpoznania w metodzie referencyjnej | Rozpoznania zgodnych rozpoznań | Wyłączone rozpoznania w oznaczeniu | PPA (LCL) | TPPV (LCL) |
|----------------------------------|--------|--|--|--------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|
| 10–25 kpz | UZYSK | 443 | 98 | 342 | 56 | 81,89% (79,01%) | 85,93% (82,82%) |
| | STRATA | 4162 | 457 | 4155 | 679 | 90,11% (89,36%) | 85,95% (85,11%) |
| 25–50 kpz | UZYSK | 355 | 117 | 370 | 76 | 75,21% (71,81%) | 82,96% (79,83%) |
| | STRATA | 1587 | 16 | 1622 | 7 | 99,00% (98,50%) | 99,57% (99,21%) |
| 50–100 kpz | UZYSK | 228 | 0 | 187 | 20 | >99,99% (98,83%) | 90,34% (86,42%) |
| | STRATA | 723 | 5 | 697 | 6 | 99,31% (98,60%) | 99,15% (98,36%) |
| ≥100 kpz | UZYSK | 371 | 1 | 335 | 5 | 99,73% (98,80%) | 98,53% (97,01%) |
| | STRATA | 541 | 23 | 569 | 1 | 95,92% (94,32%) | 99,82% (99,22%) |
| Łącznie (wszystkie CNV ≥ 10 kpz) | UZYSK | 1397 | 216 | 1234 | 157 | 86,61% (85,15%) | 88,71% (87,24%) |
| | STRATA | 7013 | 501 | 7043 | 693 | 93,33% (92,84%) | 91,04% (90,49%) |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Tabela 16 Podsumowanie NPA rozpoznań CNV TruSight Whole Genome

| Rozmiar | Typ | Zgodne rozpoznania ujemne | Wyłączone rozpoznania ujemne w metodzie referencyjnej | Wyłączone rozpoznania w oznaczeniu | NPA (LCL) |
|--|--------|---------------------------|---|------------------------------------|------------------------------|
| Łącznie (wszystkie CNV ≥ 10 kpz) | UZYSK | 548 478 033 220 | 5 701 311 | 6 400 382 | > 99,99% (> 99,99%) |
| | STRATA | 548 591 794 675 | 11 719 913 | 8 543 877 | > 99,99% (> 99,99%) |

Przebiegi dokładności homozygotyczności

Techniczną dodatnią wartość predykcyjną (TPPV) dla rozpoznań ROH oceniano przy użyciu tej samej metody referencyjnej i rozpoznań od rzekomo zdrowych dawców (195), które zostały wykorzystane w ocenach dokładności analizy małego wariantu i CNV. Zdarzenia ROH określono przez identyfikację obszarów w genomie zawierających sekwencję homozygotycznych rozpoznań SNV bez heterozygotycznych SNV lub długich luk bez wariantów. Takie obszary punktów początkowych były następnie rozszerzane w lewo i w prawo i oceniane pod kątem otaczających rozpoznań homozygotycznych lub obecności heterozygotycznych SNV. Zdarzenia ROH wykryte przez TruSight Whole Genome zostały porównane z rozpoznaniami SNV z metody referencyjnej. Podsumowanie TPPV dla rozpoznań ROH przedstawia [Tabela 17](#).

Tabela 17 TruSight Whole Genome Dokładność zdarzeń ROH ze stratyfikacją według rozmiaru

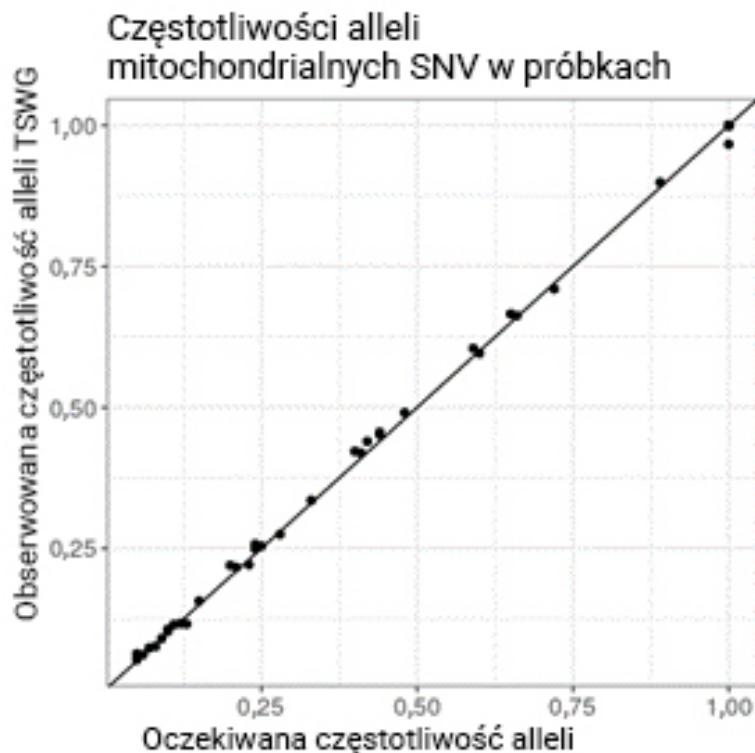
| Rozmiar | Średnia TPPV | TPPV (LCL) |
|-------------|--------------|------------|
| 10–25 kpz | 81,44% | 80,77% |
| 25–50 kpz | 82,14% | 81,82% |
| 50–100 kpz | 81,77% | 81,55% |
| 100–500 kpz | 82,19% | 81,98% |
| ≥ 10 kpz | 82,07% | 81,94% |
| ≥ 500 kpz | 85,47% | 84,66% |

Procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) w zakresie wykrywania ROH określono w zewnętrznych próbkach klinicznych poprzez porównanie rozpoznań ROH w TruSight Whole Genome z metodami ortogonalnymi, w tym mikromacierzami chromosomowymi i oceną opartą o PCR. Zdarzenie ROH uznano za wykryte, jeśli co najmniej 50% regionu zgłoszonego jako ROH metodą ortogonalną pokrywa się jednolicie ze zdarzeniami rozpoznań ROH przez TruSight Whole Genome. PPA pomiędzy Oznaczenie TruSight Whole Genome i metodami ortogonalnymi wynosiła 34/34 (100%) dla wszystkich oczekiwanych zdarzeń ROH (≥ 4 Mpz).

Dokładność heteroplazmii mitochondrialnych SNV

Dokładność rozpoznania mtSNV oceniano w 41 wcześniej przechowywanych próbkach klinicznych pochodzących z zewnętrznych ośrodków. Każda próbka kliniczna zawierała wcześniej zgłoszone mtSNV w określonym miejscu i z określonym stopniem heteroplazmy na podstawie ukierunkowanej analizy mtDNA z heteroplazmą (MITOP). Częstości alleli oszacowane przez TruSight Whole Genome były w dużym stopniu skorelowane z oczekiwanymi częstościami, zgodnie z prognozą MITOP. Wykryto wszystkie oczekiwane SNV mtDNA, co dało PPA 100% (41/41).

Rysunek 3 TruSight Whole Genome Obserwowane częstości alleli mitochondrialnych SNV w porównaniu z oczekiwanymi częstościami alleli



Przeprowadzono dodatkowe badanie dokładności mtSNV z wykorzystaniem tych samych 195 próbek krwi i metody referencyjnej opisanej w małych badaniach wariantu i dokładności CNV. Ujemny zestaw odniesienia został zdefiniowany jako rozpoznania pewnych niezmiennych bez wariantów (PRZEJŚCIE przez filtr), a dodatni zestaw odniesienia został zdefiniowany jako rozpoznania mtSNV z częstością występowania alleli > 2,5%. Pozycje oznaczone jako to, które nie przeszły przez filtr lub rozpoznania wariantu bez SNV zostały wykluczone. Podsumowanie dokładności dla mtSNV przedstawia [Tabela 18](#).

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Tabela 18 TruSight Whole Genome Dokładność rozpoznania mtDNA SNV

| Parametry dokładności | Metoda referencyjna, dodatnie zgodne | Metoda referencyjna, wyłączone dodatnie | Wyłączony wynik dodatni oznaczenia | Metoda referencyjna, ujemne zgodne | Metoda referencyjna, wyłączone ujemne | Wyłączony wynik ujemny oznaczenia | Wartość parametru dokładności (LCL) |
|-----------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| PPA | 6875 | 0 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | >99,99% (99,96%) |
| TPPV | 6875 | Nd. | 6 | Nd. | Nd. | Nd. | 99,91% (99,83%) |
| NPA | Nd. | Nd. | Nd. | 3171049 | 24268 | 20564 | 99,24% (99,23%) |

Dokładność wykrywania ekspansji STR

Dokładność wykrywania ekspansji STR opierała się na 160 całkowitych próbkach przygotowanych przez izolację gDNA od osób z klinicznym rozpoznaniem choroby z ekspansją w określonych miejscach potwierdzoną metodą PCR / Repeat-Primed (RP)-PCR lub Southern Blot wykonaną w warunkach laboratoryjnych CLIA. Progi określone w [Tabela 11](#) zostały zastosowane do zdefiniowania statusu STR allelu w określonym locus jako prawidłowego (szacowany rozmiar STR mniejszy niż lub równy progowi) lub rozszerzonego (większy niż próg).

PPA wyliczono wyłącznie przy użyciu klinicznie potwierdzonych próbek, NPA wyliczono przy użyciu tylko indywidualnych, domniemanie zdrowych próbek krwi, a TPPV obliczono w obu grupach próbek. W przypadku alleli, dla których próbki potwierdzone klinicznie nie były dostępne, nie można było obliczyć PPA. Ponadto w przypadku alleli, w których nie była dostępna potwierdzona klinicznie próbka i nie było fałszywie dodatnich rozpoznań, nie można było obliczyć TPPV. NPA obliczono dla wszystkich ekspansji STR. Liczbę próbek klinicznych przebadanych pod kątem danej ekspansji STR oraz parametry dokładności przedstawiono w [Tabela 19](#).

Tabela 19 TruSight Whole Genome Parametry dokładności dla ekspansji STR

| Ekspansja STR | Przetestowane próbki kliniczne | PPA | TPPV | NPA |
|---------------|--------------------------------|---------|---------|---------|
| AFF2 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| AR | 8 | >99,99% | >99,99% | >99,99% |
| ATN1 | 4 | >99,99% | >99,99% | >99,99% |
| ATXN1 | 7 | 66,67% | >99,99% | >99,99% |
| ATXN10 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| ATXN2 | 5 | 80,00% | >99,99% | >99,99% |
| ATXN3 | 9 | >99,99% | 90,00% | 99,74% |
| ATXN7 | 2 | >99,99% | >99,99% | >99,99% |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Ekspansja STR | Przetestowane próbki kliniczne | PPA | TPPV | NPA |
|------------------|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| ATXN7_GCC | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| ATXN8OS | 0 | Nd. | 0,00% | 99,74% |
| ATXN8OS_CTA | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| C9ORF72 | 21 | >99,99% | >99,99% | >99,99% |
| CACNA1A | 5 | >99,99% | 83,33% | 99,74% |
| CBL | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| CNpz | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| CNpz_CA | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| CNpz_CAGA | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| CSTB | 0 | Nd. | 0,00% | 99,74% |
| DIP2B | 0 | Nd. | 0,00% | 99,74% |
| DMPK | 42 | >99,99% | >99,99% | >99,99% |
| FMR1 | 47 | > 99,9% | >99,99% | >99,99% |
| FXN | 0 | Nd. | 0,00% | 99,74% |
| FXN_A | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| GLS | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| HTT | 10 | >99,99% | 83,33% | 99,49% |
| HTT_CCG | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| JPH3 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| NIPA1 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| NOP56 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| NOP56_CGCCTG | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| NOTCH2NL | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| PAPzN1 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| PHOX2B | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| PPP2R2B | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| TPz | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| WSZYSTKIE | 160 | 98,12% | 92,35% | 99,94% |

Ocena PPA ogólnego wykrywania ekspansji STR we wszystkich loci stanowi dobre przybliżenie PPA specyficznej dla locus przy użyciu dostępnych próbek klinicznych. Ocena PPA konkretnie dla locus FMR1 może służyć jako dolna granica PPA loci, które nie zostały bezpośrednio profilowane ze względu na jego duży próg nieprawidłowości rozmiaru STR.

Dokładność wykrywania alleli SMN1

Dokładność wykrywania braku alleli C w SMN1 (NM_000344.3:c.840C) oceniono w 26 próbkach klinicznych z przypadków z rozpoznaniem rdzeniowego zaniku mięśni (SMA) i homozygotyczną utratą eksonu 7 w SMN1 potwierdzoną przez emulsyjną reakcję PCR lub MLPA. Dokładność identyfikacji obecności allelu SMN1 c.840C oceniano w rzekomo zdrowych pojedynczych próbkach krwi. Do każdej próbki przypisano pojedynczy pomiar statystyczny (Prawdziwie dodatni (TP), Fałszywie dodatni (FP), Fałszywie ujemny (FN) lub Prawdziwie ujemny (TN)) na podstawie wykrytej obecności (ujemny status SMA) lub braku (dodatni status SMA) alleli C w pozycji c.840 genu SMN1 w porównaniu z oczekiwanym statusem. Szacunkowe PPA, TPPV i NPA zostały wykonane zarówno dla dodatniego, jak i ujemnego zestawu próbek (patrz [Tabela 20](#)).

Tabela 20 Parametry dokładności wykrywania braku alleli SMN1 c.840C

| Parametry dokładności | TP | FP | TN | FN | Wartość parametru dokładności |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|
| PPA | 26 | Nd. | Nd. | 0 | >99,99% |
| TPPV | 26 | 0 | Nd. | Nd. | >99,99% |
| NPA | Nd. | 0 | 195 | Nd. | >99,99% |

Powtarzalność

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Precyzję wewnątrzlaboratoryjną oceniano przy użyciu wyizolowanego gDNA z różnymi znanymi wariantami w całym genomie. Uwzględniono mtSNV w pobliżu i znacznie powyżej granicy detekcji (LoD), próbki zawierające allel SMN1 c.840C oraz próbki z powtarzającymi się rozszerzeniami FMR i HTT1 o długościach bliskich i znacznie powyżej LoD. Próbkę testowano przy użyciu dziewięciu unikalnych warunków opracowanych z udziałem trzech operatorów, trzech partii odczynników do przygotowywania biblioteki, trzech partii materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania i trzech aparatów do sekwencjonowania.

Każda próbka została przetestowana w dwóch powtórzeniach w tym samym przebiegu w celu oceny zmienności w obrębie przebiegu, a każdy przypadek testowy został przetestowany dwukrotnie w dwóch przebiegach dla jednego warunku dla oceny zmienności pomiędzy przebiegami. Każda próbka została oceniona na podstawie 36 obserwacji, a projekt zapewniał 18 stopni swobody oceny powtarzalności. Lista próbek ocenionych w panelu, typ próbki i ocenione warianty dla każdego elementu panelu przedstawia [Tabela 21](#). Próbki 1-4 i 9-12 pochodziły zarówno od mężczyzn, jak i kobiet rasy białej, czarnej i żółtej, aby zapewnić zróżnicowany zestaw próbek.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

Tabela 21 Przykładowy skład panelu wykorzystywanego w badaniu precyzji wewnątrzlaboratoryjnej

| Panel | Nr próbki | Typ próbki | Warianty |
|-------|-----------|--|---|
| A | 1 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 2 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 3 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 4 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 5 | Sztuczna mieszanina gDNA z krwi | Mitochondrialne SNV przy niskim poziomie LoD |
| | 6 | Sztuczna linia komórkowa NA202411 ¹ | Ekspansja STR w loci FMR1 przy niskim poziomie LoD |
| | 7 | Sztuczna linia komórkowa NA20208 | Ekspansja STR w loci HTT przy niskim poziomie LoD |
| | 8 | Sztuczna linia komórkowa NA23686 | Brak allelu SMN1 c.840C |
| B | 9 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 10 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 11 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 12 | gDNA z krwi | Małe warianty, CNV, ROH, STR bez ekspansji, obecność allelu SMN1 c.840C |
| | 13 | Sztuczna mieszanina gDNA z krwi | mtSNV przy wysokim poziomie LoD |
| | 14 | Sztuczna linia komórkowa NA07862 | Ekspansja STR w loci FMR1 przy wysokim poziomie LoD |
| | 15 | Sztuczna linia komórkowa NA20253 | Ekspansja STR w loci HTT przy wysokim poziomie LoD |
| | 16 | Sztuczna linia komórkowa NA03814 | Brak allelu SMN1 c.840C |

Wysoki poziom LoD: Częstotliwość wariantu allelu około 2,0x–4,0x LoD.

Niski poziom LoD: Częstotliwość wariantu allelu około 1,0x–1,5x LoD.

¹ Wyniki dla NA20241 nie zostały podane w liczbach końcowych, ponieważ stwierdzono, że są one znacznie poniżej 1,0x LoD i tym samym nie spełniły wymagań dotyczących próbek.

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

W ocenie jakościowej podaje się wskaźniki odtwarzalności, traktując warianty jako jednostki jakościowe (wariant obecny lub wariant nieobecny). Oceniano i raportowano różne definicje dodatnich lub ujemnych rozpoznań oraz różne wskaźniki jakościowe dla każdego typu wariantu (Tabela 22). Podczas oceny odtwarzalności małych powtórzeń, rozpoznań CNV i ROH, rozpoznania wariantów wykonane w powtórzeniu przebiegu charakterystyki były używane dla każdej próbki, która służyła jako punkt porównawczy dla wszystkich innych powtórzeń tej próbki w badaniu.

Tabela 22 Podsumowanie jakościowej oceny odtwarzalności dla każdego typu wariantu

| Rodzaj wariantu | Dodatni | Ujemny | Rodzaj porównania | Wskaźniki jakościowe |
|----------------------|---|--|---|--|
| Małe warianty | Rozpoznany wariant przeszedł przez filtr | Rozpoznane odniesienie homozygotyczne przeszło przez filtr | Zgodność z zestawem rozpoznań z początkowych przebiegów charakterystyki | Średnia zgodność dodatnia (APA) i średnia zgodność ujemna (ANA) |
| CNV | Rozpoznanie CNV przeszło przez filtr | Pozycje w genomie nie pokrywają się z rozpoznaniem zmienności liczby kopii, które przeszło przez filtr | Zgodność z zestawem rozpoznań z początkowych przebiegów charakterystyki | APA i ANA |
| ROH | Rozpoznanie ROH | Pozycje w genomie nie pokrywają się z rozpoznaniem ROH | Zgodność z zestawem rozpoznań z początkowych przebiegów charakterystyki | APA i ANA |
| Ekspansja STR | Próbka z ekspansją STR w co najmniej jednym docelowym locus | Próbka bez ekspansji w żadnym z docelowych loci | Zgodność ze statusem próbki definiowanym przez charakterystykę próbki w teście ortogonalnym | Procent dodatnich rozpoznań (PPC) i procent ujemnych rozpoznań (PNC) |
| Wykrycie SMN1 c.840C | Próbka bez allelu C w pozycji c.840 genu SMN1 (rozpoznanie SMA) | Próbka zawierająca co najmniej jedną kopię allelu C w pozycji c.840 genu SMN1 (brak SMA) | Zgodność ze statusem próbki definiowanym przez charakterystykę próbki w teście ortogonalnym | PPC i PNC |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Rodzaj wariantu | Dodatni | Ujemny | Rodzaj porównania | Wskaźniki jakościowe |
|-----------------|---|---|--|----------------------|
| mtSNV | Rozpoznane mitochondrialne SNV przechodzi przez filtr | Pozycje niewariantowe chromosomu mitochondrialnego przechodzą przez filtr | Zgodność z rozpoznaniem wariantowymi i niewariantowymi wykonanymi w nierozcieńczonych próbkach | PPC i PNC |

Ocena ilościowa różnych typów wariantów obejmowała ocenę zmienności wskaźników ilościowych, które stanowią podstawę rozpoznania jakościowych albo, w przypadku małych wariantów, wskaźników zgodności w odniesieniu do zestawu rozpoznania referencyjnych. Badanie to obejmowało zarówno ocenę całkowitej zmienności w parametrach ilościowych w powtórzeniach, jak i wpływ różnych czynników uwzględnionych w badaniu na zmienność takich parametrów ilościowych poprzez analizę składowych wariacji. [Tabela 23](#) podsumowuje wskaźniki ilościowe używane do analizy każdego typu wariantu, a także czynniki, które zostały ocenione pod kątem przyczyniania się do zmienności w parametrze ilościowym.

Tabela 23 Podsumowanie parametrów ilościowych stosowanych w ocenie precyzji dla różnych rodzajów wariantów

| Rodzaj wariantu | Parametry ilościowe | Czynniki oceniane pod kątem przyczyniania się do zmienności |
|-----------------|--|--|
| Małe warianty | APA i ANA | Operator, partia zestawu do przygotowania biblioteki, urządzenie, partia materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania, podtyp wariantu, kontekst genomowy |
| CNV | Znormalizowana głębokość pokrycia w regionie CNV | Operator, partia zestawu do przygotowania biblioteki, urządzenie, partia materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania, podtyp wariantu, długość wariantu |
| ROH | Wynik ROH w regionie ROH | Operator, partia zestawu do przygotowania biblioteki, urządzenie, partia materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania, podtyp wariantu, długość wariantu |
| Ekspansja STR | Szacunkowy rozmiar STR | Operator, partia zestawu do przygotowania biblioteki, urządzenie, partia materiałów eksploatacyjnych sekwencjonowania, miejsce STR, długość STR |

TruSight Whole Genome – ulotka dołączona do opakowania illumina®

| Rodzaj wariantu | Parametry ilościowe | Czynniki oceniane pod kątem przyczyniania się do zmienności |
|----------------------|--|---|
| Wykrycie SMN1 c.840C | Logarytmiczny wskaźnik wiarygodności dla obecności allelu referencyjnego (C) w pozycji docelowej | Operator, partia zestawu do przygotowania biblioteki, narzędzie, partia materiałów eksploatacyjnych sekwencjonowania, status SMA |
| Mitochondrialne SNV | Częstość wariantu allelu | Operator, partia zestawu do przygotowania biblioteki, narzędzie, partia materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania, pozycja wariantu, oczekiwana częstotliwość wariantu allelu |

Wyniki analizy składników wariacji przedstawiono w [Tabela 24](#). W przypadku małych wariantów większość wariacji przypisano błędowi resztowemu i nie wyjaśniono tego czynnikami związanymi z testem uwzględnionymi w projekcie, takimi jak partia zestawu do sekwencjonowania, aparat do sekwencjonowania, partia zestawu do przygotowania biblioteki, operator i różnice między przebiegami. Jedyne wyjątki zaobserwowano w przypadku SNV w pośrednich regionach ufności, dla których większość wariacji przypisano do partii zestawu do sekwencjonowania. Ogólnie rzecz biorąc, wyższą wartość wariacji przypisano czynnikom związanym z testem dla małych wariantów w regionach o niskim poziomie ufności genomu. W przypadku wszystkich pozostałych typów wariantów większość wariacji przypisano błędom resztowym, a nie czynnikom związanym z testem. To badanie pokazuje, że w przypadku większości podtypów małych wariantów można zastosować filtrowanie dla obszarów o wysokim i średnim stopniu ufności w genomie w celu zwiększenia powtarzalności i ograniczenia zmienności testu. [Odtwarzalność zewnętrzna na stronie 66](#) zapewnia kompleksową analizę odtwarzalności testu.

Tabela 24 Wyniki badania analizy składowych odchyleń

| Metryka | Podtypy wariantów | Poziom ufności | Resztkowe | Partia zestawu do sekwencjonowania | Pomiędzy przebiegami | Aparat | Partia zestawów do przygotowania biblioteki | Operator |
|---------|----------------------------|----------------|-----------|------------------------------------|----------------------|--------|---|----------|
| APA | Krótka delecja (1-5 pz) | Wysoki | 79,36% | 17,52% | 0,00% | 0,00% | 3,13% | 0,00% |
| | | Średni | 76,97% | 18,59% | 1,53% | 0,00% | 2,91% | 0,00% |
| | | Niski | 67,85% | 24,87% | 4,4% | 0,00% | 2,88% | 0,00% |
| | Średnia delecja (6-15 pz) | Średni | 61,17% | 29,06% | 7,42% | 0,00% | 2,35% | 0,00% |
| | | Niski | 59,33% | 31,76% | 6,38% | 0,17% | 2,35% | 0,00% |
| | Długa delecja (16-31 pz) | Średni | 52,93% | 33,72% | 11,67% | 0,17% | 1,51% | 0,00% |
| | | Niski | 49,10% | 37,01% | 11,08% | 1,42% | 1,39% | 0,00% |
| | Krótka insercja (1-5 pz) | Wysoki | 89,93% | 7,32% | 1,76% | 0,00% | 0,99% | 0,00% |
| | | Średni | 74,52% | 19,96% | 3,44% | 0,00% | 2,08% | 0,00% |
| | | Niski | 60,64% | 29,72% | 8,49% | 0,00% | 1,15% | 0,00% |
| | Średnia insercja (6-15 pz) | Średni | 81,76% | 15,78% | 0,00% | 0,00% | 2,41% | 0,06% |
| | | Niski | 51,28% | 35,07% | 12,07% | 0,00% | 1,58% | 0,00% |
| | Długa insercja (16-31 pz) | Średni | 87,59% | 9,83% | 1,18% | 0,00% | 1,40% | 0,00% |
| | | Niski | 52,47% | 35,32% | 10,14% | 0,23% | 1,85% | 0,00% |
| | SNV | Wysoki | 78,01% | 17,45% | 0,00% | 0,13% | 1,23% | 3,17% |
| Średni | | 79,71% | 16,95% | 0,77% | 0,20% | 1,29% | 1,09% | |
| Niski | | 56,63% | 36,08% | 6,97% | 0,22% | 0,00% | 0,09% | |
| ANA | SNV | Wysoki | 55,07% | 21,84% | 21,07% | 1,80% | 0,21% | 0,00% |
| | | Średni | 28,53% | 49,08% | 20,11% | 1,27% | 1,00% | 0,00% |
| | | Niski | 51,78% | 36,04% | 9,76% | 2,42% | 0,00% | 0,00% |

| Metryka | Podtypy wariantów | Poziom ufności | Resztkowe | Partia zestawu do sekwencjonowania | Pomiędzy przebiegami | Aparat | Partia zestawów do przygotowania biblioteki | Operator |
|-----------|-------------------------------|----------------|-----------|------------------------------------|----------------------|--------|---|----------|
| Głębokość | UZYSK CNV (10 kpz, 25 kpz) | Nd. | 73,28% | 2,87% | 0,00% | 0,00% | 1,01% | 0,00% |
| | UZYSK CNV (25 kpz, 50 kpz) | Nd. | 72,99% | 5,25% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,56% |
| | UZYSK CNV (50 kpz, 100 kpz) | Nd. | 66,40% | 5,16% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | UZYSK CNV (100 kpz, 500 kpz) | Nd. | 43,51% | 14,92% | 14,01% | 0,20% | 0,00% | 15,72% |
| | STRATA CNV (10 kpz, 25 kpz) | Nd. | 83,41% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | STRATA CNV (25 kpz, 50 kpz) | Nd. | 84,67% | 1,20% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | STRATA CNV (50 kpz, 100 kpz) | Nd. | 84,16% | 2,43% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | STRATA CNV (100 kpz, 500 kpz) | Nd. | 81,25% | 5,22% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,55% |

| Metryka | Podtypy wariantów | Poziom ufności | Resztkowe | Partia zestawu do sekwencjonowania | Pomiędzy przebiegami | Aparat | Partia zestawów do przygotowania biblioteki | Operator |
|------------------|------------------------|----------------|-----------|------------------------------------|----------------------|--------|---|----------|
| Wynik w regionie | ROH (1 kpz, 10 kpz) | Nd. | 74,32% | 1,65% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,52% |
| | ROH (10 kpz, 25 kpz) | Nd. | 84,78% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | ROH (25 kpz, 50 kpz) | Nd. | 84,92% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | ROH (50 kpz, 100 kpz) | Nd. | 85,63% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | ROH (100 kpz, 500 kpz) | Nd. | 85,76% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | ROH \geq 500 kpz | Nd. | 84,81% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |

| Metryka | Podtypy wariantów | Poziom ufności | Resztkowe | Partia zestawu do sekwencjonowania | Pomiędzy przebiegami | Aparat | Partia zestawów do przygotowania biblioteki | Operator |
|---|----------------------|----------------|-----------|------------------------------------|----------------------|--------|---|----------|
| Szacunkowy rozmiar STR loci ¹ | AFF2 | Nd. | 99,43% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | ATXN7 | Nd. | 100% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | ATXN7_GCC | Nd. | 99,43% | 0,57% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | CNpz | Nd. | 100% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | CNpz_CA | Nd. | 95,45% | 4,55% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | CSTB | Nd. | 96,45% | 0,87% | 2,57% | 0,00% | 0,00% | 0,11% |
| | DIP2B | Nd. | 100% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | FMR1 | Nd. | 71,02% | 10,06% | 0,00% | 17,33% | 0,64% | 0,95% |
| | FXN_A | Nd. | 94,52% | 1,37% | 0,00% | 1,37% | 1,37% | 1,37% |
| | HTT | Nd. | 82,23% | 0,00% | 11,99% | 3,81% | 0,00% | 1,97% |
| | HTT_CCG | Nd. | 99,43% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | NOTCH2NL | Nd. | 99,43% | 0,00% | 0,00% | 0,29% | 0,29% | 0,00% |
| Tpz | Nd. | 90,91% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | |
| Logarytmiczny wskaźnik prawdopodobieństwa | c.840C w NA03814 | Nd. | 65,71% | 18,98% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 15,32% |
| | c.840C w NA23686 | Nd. | 87,64% | 0,00% | 0,00% | 5,90% | 0,00% | 6,46% |
| VAF | mtSNVs w pobliżu LOD | Nd. | 83,13% | 0,37% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,05% |

¹ Nie przeprowadzono analizy składowych odchyłeń dla loci, dla których nie zaobserwowano odchyłeń.

Ulotka dołączona do opakowania

Odtwarzalność zewnętrzna

Odtwarzalność zewnętrzną określono przy użyciu pojedynczej partii odczynników do przygotowywania i sekwencjonowania biblioteki w trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych z dwoma operatorami w każdym ośrodku. Te same próbki, które zostały wykorzystane w badaniu [Precyzja wewnętrzzaboratoryjna na stronie 57 \(Tabela 21\)](#), zostały wykorzystane w badaniu odtwarzalności z jednym wyjątkiem: próbka NA20241 została zastąpiona NA20239 w celu oceny ekspansji FMR1 loci STR przy niskim LoD. Łącznie przetestowano 16 unikalnych próbek w dwóch podpanelach po osiem unikalnych próbek (Panel A i Panel B) przez każdego operatora w każdym ośrodku. Wykonano trzy przebiegi sekwencjonowania dla powtórzonych bibliotek każdego panelu podrzędnego, co daje łącznie 36 przebiegów sekwencjonowania na unikalną próbkę.

Wskaźnik powodzenia w 576 bibliotekach próbek z ważnymi przebiegami sekwencjonowania, zdefiniowany jako liczba próbek, które przy pierwszej próbie spełniały parametry kontroli jakości biblioteki próbek, wyniósł 99,1% (571/576; 95% CI: 98,0%, 99,6%). Wszystkie wyniki testu dotyczą pierwszego badania.

Powtarzalność SNV, insercje, delecje, CNV i ROH oceniano poprzez porównanie danych z zestawem rozpoznań referencyjnych na podstawie zwykłej wydajności w trzech przebiegach charakterystyki ([Tabela 25](#) i [Tabela 26](#)). Powtarzalność ekspansji STR, brak allelu SMN1 c.840C oraz mtSNV oceniano poprzez porównanie danych ze znanym statusem ([Tabela 27](#)).

Tabela 25 Odtwarzalność TruSight Whole Genome dla SNV, CNV i ROH

| Typ wariantu – stratyfikacja | Zgodne rozpoznania dodatnie ¹ / Rozpoznania dodatnie ² | | | Średnia zgodność wyników dodatnich (%) (95% CI) ³ |
|--|---|---------------|---------------|---|
| | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | |
| Małe warianty (wysoki poziom ufności) | | | | |
| SNV | 687 996 150 / | 666 509 635 / | 688 001 697 / | 99,9 |
| | 688 770 402 | 667 253 493 | 688 766 887 | (99,9-99,9) |
| Insercje — 1-5 pz | 34 087 135 / | 33 025 772 / | 34 089 204 / | 99,9 |
| | 34 137 298 | 33 073 087 | 34 137 792 | (99,9-99,9) |
| Delecje — 1-5 pz | 44 096 186 / | 42 733 935 / | 44 102 515 / | 99,6 |
| | 44 255 442 | 42 883 089 | 44 256 695 | (99,6-99,6) |
| Małe warianty (średni poziom ufności) | | | | |
| SNV | 42 238 226 / | 40 920 370 / | 42 236 751 / | 98,8 |
| | 42 737 228 | 41 391 560 | 42 725 827 | (98,8-98,9) |
| Insercje — 1-5 pz | 11 075 073 / | 10 734 488 / | 11 080 468 / | 98,9 |
| | 11 204 210 | 10 855 790 | 11 204 818 | (98,9-99,9) |
| Insercje — 6-15 pz | 4 307 181 / | 4 173 626 / | 4 308 408 / | 99,3 |
| | 4 339 975 | 4 205 261 | 4 340 277 | (99,2-99,3) |
| Insercje — ≥ 16 pz | 611 952 / | 593 114 / | 612 222 / | 96,8 |
| | 632 214 | 612 877 | 632 498 | (96,8-96,8) |
| Delecje — 1-5 pz | 24 571 502 / | 23 814 655 / | 24 586 095 / | 98,9 |
| | 24 851 492 | 24 076 930 | 24 855 041 | (98,9-98,9) |
| Delecje — 6-15 pz | 8 737 319 / | 8 473 410 / | 8 746 773 / | 98,2 |
| | 8 900 796 | 8 624 403 | 8 902 016 | (98,2-98,2) |
| Delecje — ≥ 16 pz | 3 590 282 / | 3 481 192 / | 3 594 420 / | 95,0 |
| | 3 779 907 | 3 662 448 | 3 780 659 | (95,0-95,0) |
| Małe warianty (niski poziom ufności) | | | | |
| SNV | 78 507 103 / | 76 365 789 / | 78 863 977 / | 81,2 |
| | 96 859 682 | 94 066 720 | 97 058 652 | (81,2-81,2) |

| Typ wariantu – stratyfikacja | Zgodne rozpoznania dodatnie ¹ / Rozpoznania dodatnie ² | | | Średnia zgodność wyników dodatnich (%) (95% CI) ³ |
|------------------------------|---|--------------|--------------|---|
| | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | |
| Insercje — 1-5 pz | 17 312 805 / | 16 859 987 / | 17 406 355 / | 89,6 |
| | 19 370 351 | 18 807 745 | 19 418 516 | (89,5-89,6) |
| Insercje — 6-15 pz | 5 543 985 / | 5 404 652 / | 5 584 241 / | 85,1 |
| | 6 529 886 | 6 338 556 | 6 550 066 | (85,1-85,2) |
| Insercje — ≥ 16 pz | 3 284 197 / | 3 205 165 / | 3 314 025 / | 77,0 |
| | 4 275 286 | 4 158 315 | 4 298 399 | (77,0-77,0) |
| Delecje — 1-5 pz | 31 659 416 / | 30 751 952 / | 31 746 379 / | 92,7 |
| | 34 194 748 | 33 158 757 | 34 226 245 | (92,7-92,7) |
| Delecje — 6-15 pz | 9 189 220 / | 8 928 794 / | 9 217 516 / | 92,1 |
| | 9 987 568 | 9 684 179 | 9 995 101 | (92,1-92,2) |
| Delecje — ≥ 16 pz | 3 335 400 / | 3 241 968 / | 3 346 219 / | 85,4 |
| | 3 909 364 | 3 791 331 | 3 912 857 | (85,4-85,5) |
| CNV — uzysk ≥ 10 kpz | 7 883 / | 7 664 / | 7 916 / | 95,5 |
| | 8 275 | 8 012 | 8 282 | (95,2-95,8) |
| CNV — utrata ≥ 10 kpz | 11 517 / | 11 248 / | 11 516 / | 95,3 |
| | 12 089 | 11 777 | 12 113 | (95,1-95,5) |
| ROH — ≥ 500 kpz | 6 641 / | 6 519 / | 6 616 / | 98,0 |
| | 6 765 | 6 663 | 6 756 | (97,8-98,2) |

¹ Całkowita liczba dodatnich rozpoznań zgodnych = dodatni wynik zgodności zapytań (QCP) + dodatni wynik referencyjny zgodności (RCP).

² Łączna liczba dodatnich rozpoznań = dodatni wynik zgodności zapytań (QCP) + dodatni wynik wyłączonych zapytań (QEP) + dodatnia zgodność referencyjna (RCP) + dodatnie wyłączone rozpoznania referencyjne (REP).

³ 2-stronny 95% przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Tabela 26 Odtwarzalność TruSight Whole Genome ANA w przypadku SNV, CNV i ROH

| Typ wariantu – stratyfikacja | Zgodne rozpoznania ujemne ¹ / Rozpoznania ujemne ² | | | Średnia zgodność wyników ujemnych (%) (95% CI) ³ |
|---------------------------------------|---|-------------------|-------------------|--|
| | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | |
| Małe warianty (wysoki poziom ufności) | 486 282 620 918 / | 470 948 205 740 / | 486 285 759 770 / | > 99,9 |
| | 486 388 081 375 | 471 054 131 230 | 486 389 857 817 | (>99,9->99,9) |
| Małe warianty (średni poziom ufności) | 17 249 915 828 / | 16 699 106 194 / | 17 253 834 878 / | 99,0 |
| | 17 427 817 811 | 16 874 794 553 | 17 429 035 482 | (99,0-99,0) |
| Małe warianty (niski poziom ufności) | 24 072 615 254 / | 23 454 103 344 / | 24 180 801 788 / | 94,0 |
| | 25 608 493 410 | 24 947 163 687 | 25 695 956 102 | (94,0-94,0) |
| CNV — uzysk ≥ 10 kpz | 592 486 270 144 / | 573 973 293 084 / | 592 487 297 632 / | > 99,9 |
| | 592 500 222 476 | 573 985 772 396 | 592 500 614 241 | (>99,9->99,9) |
| CNV — utrata ≥ 10 kpz | 592 548 802 882 / | 574 030 570 254 / | 592 547 683 360 / | > 99,9 |
| | 592 559 825 216 | 574 041 311 257 | 592 559 141 007 | (>99,9->99,9) |
| ROH — ≥ 500 kpz | 542 968 586 606 / | 525 724 060 526 / | 543 014 319 116 / | 99,2 |
| | 547 402 885 905 | 530 011 754 808 | 547 444 495 449 | (99,2-99,2) |

¹ Łączna liczba zgodnych rozpoznań ujemnych = 2 × zgodność ujemna.

² Całkowita liczba ujemnych rozpoznań = 2 × zgodność ujemna + ujemne wyłączone rozpoznania referencyjne (REN) + ujemne wyłączone zapytania (QEN).

³ 2-stronny 95% przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Tabela 27 Odtwarzalność TruSight Whole Genome dla STR, SMN1 i mtSNV

| Typ wariantu – stratyfikacja | Suma oczekiwanych rozpoznań dodatnich | Rozpoznania dodatnie | | | Suma oczekiwanych rozpoznań ujemnych | Rozpoznania ujemne | | | Procent rozpoznań dodatnich (95% CI) ¹ | Procent rozpoznań ujemnych (95% CI) ¹ |
|--|---------------------------------------|----------------------|-----------|-----------|--------------------------------------|--------------------|-----------|-----------|---|--|
| | | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | | |
| Ekspansje STR — wysoki poziom wykrywania (2x-4x LOD) | | | | | | | | | | |
| Ekspansje STR — FMR1 | 35 | 12 | 11 | 12 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 100 (90,1-100) | Nd. |
| Ekspansje STR — HTT | 36 | 12 | 12 | 12 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 100 (90,4-100) | Nd. |
| Ekspansje STR — FMR1 i HTT łącznie | 71 | 24 | 23 | 24 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 100 (94,9-100) | Nd. |
| Ekspansje STR — niski poziom wykrywania (1x-1,5x LOD) | | | | | | | | | | |
| Ekspansje STR — FMR1 | 36 | 11 | 10 | 11 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 88,9 (74,7-95,6) | Nd. |
| Ekspansje STR — HTT | 36 | 12 | 12 | 12 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 100 (90,4-100) | Nd. |
| Ekspansje STR — FMR1 i HTT łącznie | 72 | 23 | 22 | 23 | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 94,4 (86,6-97,8) | Nd. |

| Typ wariantu – stratyfikacja | Suma oczekiwanych rozpoznań dodatnich | Rozpoznanie dodatnie | | | Suma oczekiwanych rozpoznań ujemnych | Rozpoznanie ujemne | | | Procent rozpoznaniań dodatnich (95% CI) ¹ | Procent rozpoznaniań ujemnych (95% CI) ¹ |
|---|---------------------------------------|----------------------|-----------|-----------|--------------------------------------|--------------------|-----------|-----------|--|---|
| | | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | | Ośrodek 1 | Ośrodek 2 | Ośrodek 3 | | |
| Ekspansje STR – łącznie 28 głównych docelowych loci STR | Nd. | Nd. | Nd. | Nd. | 285 | 96 | 93 | 96 | Nd. | 100 (98,7-100) |
| Brak allelu SMN1 c.840C | 71 | 24 | 24 | 23 | 285 | 96 | 93 | 96 | 100 (94,9-100) | 100 (98,7-100) |
| mtSNV – wysoki poziom (2x-4x LOD) | 1080 | 360 | 360 | 360 | 457,524 | 152,491 | 152,489 | 152,484 | 100 (99,6-100) | > 99,9 (>99,9->99,9) |
| mtSNV – niski poziom (1x-1,5x LOD) | 1080 | 360 | 359 | 360 | 457,524 | 152,481 | 152,489 | 152,483 | 99,9 (99,5-99,9) | > 99,9 (>99,9->99,9) |

¹ 95% dwustronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Rozwiązywanie problemów

Aby rozwiązać problemy powstałe w przebiegu pracy, należy korzystać z poniższej tabeli. Jeśli przebieg sekwencjonowania lub przygotowanie biblioteki dla próbki dwukrotnie zakończy się niepowodzeniem, do rozwiązania problemu może być konieczne podjęcie dodatkowych czynności. Skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|--------------------------------|--|--|--|
| Problem z tworzeniem przebiegu | Nie można ręcznie wybrać powiązanego zaplanowanego przebiegu Oprogramowanie sterujące NovaSeq 6000Dx po załadowaniu materiałów eksploatacyjnych | Podczas planowania przebiegu określono nieprawidłowy identyfikator próbówki Library | Patrz Zmiana Przebiegu w TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931). |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|------------------------------------|--|--|---|
| Problem dotyczący sekwencjonowania | Stan niespełniania wymagań sekwencjonowania w Illumina Run Manager | Przebieg sekwencjonowania został przerwany lub nie został zakończony z powodu problemu z obsługą materiałów eksploatacyjnych NovaSeq 6000Dx lub sekwencjonowania | Patrz Dokumentacja NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105). Po rozwiązaniu problemu bibliotekę można ponownie połączyć w pulę i zmienić jej kolejność maksymalnie jeden raz (ze względu na ilość). |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|-----------------|------------|---|---|
| | | Uruchomienie zakończonych, ale nie powiodło się. Możliwy problem NovaSeq 6000Dx, problem z obsługą materiałów eksploatacyjnych sekwencjonowania lub poważna awaria przygotowania biblioteki z powodu problemu z obsługą odczynników lub błędu operatora (np. pominięcie kroku lub odrzucenie zamiast przeniesienia nadsącza podczas wyboru wielkości) | <p>Należy ocenić wydajność poszczególnych bibliotek w FLP metodą qPCR dla $\geq 0,94$ nM (przy założeniu rozmiaru płytki 450 pz) w celu wprowadzenia/wyjścia z biblioteki w porównaniu z problemami związanymi z sekwencjonowaniem.</p> <p>Jeśli wykluczono problemy z przygotowaniem biblioteki i podejrzewa się problem związany z sekwencjonowaniem, należy zapoznać się z Dokumentacją NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105).</p> <p>W przypadku podejrzenia wystąpienia problemu z przygotowaniem biblioteki należy zapoznać się z Porady i techniki na stronie 14 i Instrukcja użytkowania na stronie 17 przed powtórzeniem przygotowania biblioteki i sekwencjonowania. W przypadku powtarzających się niepowodzeń należy skontaktować się z działem pomocy Illumina technicznej.</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|---|---|--|---|
| Nie można przesłać danych sekwencjonowania do serwera | Status niepowodzenia przesyłania pliku sekwencjonowania do analizy w Illumina Run Manager | Problem z łącznością siecią lub zakłócenie zasilania aparatu lub serwera podczas przesyłania danych podczas przesyłania danych przebiegu | <p>Sprawdzić, czy nie ma zakłóceń zasilania lub utraty łączności z siecią urządzenia. Poczekaj, aż system będzie bezczynny (ukończenie sekwencjonowania), a następnie przejdź do Ustawień urządzenia, USTAWIENÍ IVD, aby potwierdzić połączenie z określoną lokalizacją wyjściową za pomocą funkcji Browse (Przełóżaj).</p> <p>Jeśli wymagane jest dalsze rozwiązywanie problemów, należy zapoznać się z Dokumentacją NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105). Jeśli po rozwiązaniu problemów z połączeniem lub zasilaniem przesyłanie pliku nie zostanie uruchomione ponownie i zakończone, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej Illumina.</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|----------------------------|--|--|--|
| Analiza nie rozpoczyna się | Stan analizy nie został rozpoczęty w Illumina Run Manager mimo zakończenia przesyłania pliku sekwencjonowania do analizy | Parowanie lub połączenie między urządzeniem a DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx zostało utracone lub licencja DRAGEN wygasła. | <p>Poczekać, aż system będzie bezczynny (sekwencjonowanie zostanie zakończone), a następnie przejść do DRAGEN, aby potwierdzić, że licencja DRAGEN jest ważna. Jeśli licencja wygasła, należy skontaktować się z Illumina. Jeśli licencja jest ważna, wybrać Run Self-Test (Uruchom autotest). Jeśli test nie powiedzie się lub jeśli opcja przeprowadzenia autotestu jest niedostępna, należy zalogować się do aparatu, aby sprawdzić, czy wystąpił błąd związany z parowaniem serwera. Patrz punkt Konfiguracja systemu w Dokumentacja NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105).</p> <p>Analiza powinna rozpocząć się automatycznie po rozwiązaniu problemu. Wyjść ze strony i przejść do zakładki Aktywne serie, aby potwierdzić, że analiza jest w toku. Jeśli problem będzie się powtarzał, należy skontaktować się z Illumina.</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|-------------------------|--|--|---|
| Analiza zablokowała się | Analiza w toku przez Illumina Run Manager znacznie dłużej niż oczekiwano | Łączność sieciowa lub zasilanie urządzenia lub serwera mogły zostać zakłócone podczas analizy, co spowodowało zablokowanie analizy | <p>Należy anulować analizę i sprawdzić, czy nie doszło do zakłócenia zasilania lub utraty łączności z siecią urządzenia.</p> <p>Poczekać, aż system będzie bezczynny (ukończenie sekwencjonowania), a następnie przejść do Ustawień urządzenia (USTAWIENIA IVD) i potwierdzić połączenie z określoną lokalizacją wyjścia. Jeśli wymagane jest dalsze rozwiązywanie problemów, należy zapoznać się z Dokumentacją NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105).</p> <p>Po rozwiązaniu problemu należy pobrać analizę bez zmian. Patrz TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931).</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|--|---|---|---|
| Nie udało się przesłać plików analizy | Status niepowodzenia przesłania pliku analizy do pamięci masowej w Illumina Run Manager | Problem z łącznością sieciową lub zakłócenie zasilania urządzenia lub serwera podczas przesyłania plików analizy | <p>Należy anulować analizę i sprawdzić, czy nie doszło do zakłócenia zasilania lub utraty łączności z siecią urządzenia.</p> <p>Poczekać, aż system będzie bezczynny (ukończenie sekwencjonowania), a następnie przejść do Ustawień urządzenia (USTAWIENIA IVD) i potwierdzić połączenie z określoną lokalizacją wyjścia. Jeśli wymagane jest dalsze rozwiązywanie problemów, należy zapoznać się z Dokumentacją NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105).</p> <p>Po rozwiązaniu problemu należy pobrać analizę bez zmian. Patrz TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931).</p> |
| Analiza nie powiodła się w ponownym ustawieniu w kolejce | Analiza nie powiodła się po w ponownym ustawieniu w kolejce | W przypadku kolejkowania analizy oryginalny przebieg mógł zostać usunięty lub zarchiwizowany i nie znajduje się już w lokalizacji określonej dla zewnętrznej lokalizacji przechowywania | Sprawdzić, czy oryginalny przebieg nadal znajduje się w zewnętrznej lokalizacji przechowywania. W przypadku zarchiwizowania należy odzyskać dane z archiwum, a następnie ponownie wykonać analizę. |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|---|--|--|--|
| Sequencing QC fails (Kontrola jakości sekwencjonowania zakończona niepowodzeniem) | Wynik NIEPOWODZENIE w podsumowaniu wyników kontroli jakości w skonsolidowanym raporcie | „Łączny % \geq Q30” poniżej specyfikacji analitycznej z powodu niewłaściwego obchodzenia się z materiałami eksploatacyjnymi do sekwencjonowania (niepowodzenie całkowitego rozmrożenia lub odwrócenie w celu wymieszania po rozmrożeniu) | Patrz Dokumentacja NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105). Po rozwiązaniu problemu bibliotekę można ponownie połączyć w pulę i zmienić jej kolejność maksymalnie jeden raz (ze względu na ilość). |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|--|---|--|---|
| Niepowodzenie kontroli jakości FASTQ dla wszystkich próbek | Podsumowanie wyników FASTQ QC i Podsumowanie biblioteki próbek podsumowania zakończone NIEPOWODZENIEM, a wyniki parametrów kontroli jakości poszczególnych bibliotek zgłoszono jako ND, w przypadku wszystkich próbek w raporcie skonsolidowanym z sekwencyjnym podsumowaniem wyników zakończonych POWODZENIEM. | Zestaw adaptera indeksu określony podczas tworzenia przebiegu nie jest zgodny z zestawem używanym podczas przygotowywania biblioteki | Należy wyświetlić próbki w celu przejrzania informacji o indeksie użytych w analizie w IRM. Jeśli wymagana jest korekta, należy zapoznać się z punktem Ponowne umieszczenie analizy w kolejce w TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument nr 200049931). |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|---|---|---|--|
| Test jakości FASTQ nie powiódł się dla jednej lub więcej próbek przy braku niskiego uzysku przebiegu; nieindeksowany całkowity uzysk (GB) \geq 2800 GB w przypadku S4 lub \geq 1000 GB w przypadku S2 | Podsumowanie wyników FASTQ QC i Podsumowanie biblioteki próbek podsumowania zakończone NIEPOWODZENIEM, a wyniki parametrów kontroli jakości poszczególnych bibliotek zgłoszono jako ND, w przypadku jednej lub kilku, ale nie wszystkich próbek w raporcie skonsolidowanym bez niskiego uzysku z przebiegu. | Błędy użycia podczas przygotowywania biblioteki lub łączenia w pulę | <p>Oceń pozostałą objętość (objętości) na ostatniej płytce biblioteki (FLP), aby potwierdzić błąd użycia pomijających próbki z połączonych bibliotek. Objętość umożliwi operatorowi ponowne połączenie w pulę i ponowne sekwencjonowanie próbki maksymalnie jeden raz. Alternatywnie można ponownie umieścić w kolejce próbki, które nie spełniły wymagań, w następnej partii przygotowania biblioteki i wykonać przebieg po zapoznaniu się z Instrukcja użytkowania na stronie 17.</p> <p>Opcjonalnie można ocenić wydajność poszczególnych bibliotek w FLP metodą qPCR dla \geq 0,94 nM (przy założeniu rozmiaru rozmiaru 450 pz) w celu uwzględnienia/wykluczenia problemów związanych z przygotowaniem biblioteki. Umieścić ponownie w kolejce próbki niespełniające wymagań w następnej partii przygotowania biblioteki i wykonać serię po zapoznaniu się z Instrukcja użytkowania na stronie 17.</p> <p>Nie zaleca się łączenia bibliotek pomiędzy partiami przygotowania biblioteki ze względu na wahania wyników między partiami, które mogą skutkować wyższym %CV i większą częstością niepowodzenia „średniego pokrycia autosomalnego”.</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|---|--|---|--|
| Wynik kontroli jakości FASTQ nie spełnia wymagań w przypadku niektórych, ale nie wszystkich próbek o niskiej wydajności przebiegu; niski nieindeksowany całkowity uzysk (GB), < 2800 GB w przypadku S4 lub < 1000 GB w przypadku S2 | Podsumowanie wyniku kontroli jakości FASTQ i podsumowanie kontroli jakości biblioteki próbki NIE SPEŁNIA wymagań, a wyniki parametrów QC poszczególnych bibliotek zostały zgłoszone jako ND dla jednej lub kilku próbek w raporcie skonsolidowanym w przypadku zgłaszania niskiej wydajności w przypadku wszystkich próbek | Może wskazywać na przygotowanie biblioteki lub problem związany z sekwencjonowaniem | <p>Opcjonalnie można ocenić wydajność poszczególnych bibliotek w FLP metodą qPCR dla $\geq 0,94$ nM (przy założeniu rozmiaru rozmiaru 450 pz) w celu uwzględnienia/wykluczenia problemów związanych z przygotowaniem biblioteki w porównaniu z problemami z sekwencjonowaniem.</p> <p>W przypadku podejrzewania problemu z sekwencjonowaniem, zapoznać się z Dokumentacją NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument nr 200010105). Po rozwiązaniu problemu biblioteki można ponownie połączyć i sekwencjonować maksymalnie jeden raz (ze względu na ograniczoną objętość).</p> <p>W przypadku podejrzenia wystąpienia problemu z przygotowaniem biblioteki należy zapoznać się z Porady i techniki na stronie 14 i Instrukcja użytkowania na stronie 17 przed powtórzeniem przygotowania biblioteki i sekwencjonowania. W przypadku powtarzających się niepowodzeń należy skontaktować się z działem pomocy Illumina technicznej.</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|--|---|--|---|
| Niepowodzenie kontroli jakości biblioteki z powodu niskiego pokrycia | Niepowodzenie wyniku kontroli jakości biblioteki próbek podsumowania dla jednej lub więcej próbek w skonsolidowanym raporcie z powodu średniego pokrycia autosomalnego i/lub procentu autosomu z pokryciem większym niż 20X i/lub średniego pokrycia mitochondrialnego w genomie nie spełniającym wymagań specyfikacji analitycznej | Problemy z jakością próbki lub przygotowaniem biblioteki | <p>Przeprowadzić ponowne oznaczenie ilościowe za pomocą kontroli procesu, aby wykluczyć problemy związane z ilością wejściową DNA.</p> <p>Przed ponownym umieszczeniem w kolejce próbki (próbek) w następnej partii przygotowania biblioteki i przeprowadzeniem przebiegu należy zapoznać się z Porady i techniki na stronie 14 i Instrukcja użytkowania na stronie 17. Jeśli powtarza się niepowodzenie z tą samą próbką/tymi samymi próbkami, może to wskazywać na problemy z jakością próbki.</p> <p>W przypadku ponownego zaobserwowania niespełniania wymagań, ale w przypadku różnych próbek, może to wskazywać na problem związany z przygotowaniem biblioteki związany z operatorem, odczynnikiem, materiałem eksploatacyjnym lub sprzętem. Jeśli problem się utrzymuje, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.</p> |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|--|---|--|--|
| Niespełnianie wymagań kontroli jakości biblioteki w oparciu o obciążenie GC | Niepowodzenie wyniku kontroli jakości biblioteki próbek podsumowania dla jednej lub więcej próbek w raporcie skonsolidowanym z powodu znormalizowanego pokrycia przy 60% do 79% kategorii GC i/lub znormalizowanego pokrycia przy od 20% do 39% kategorii GC, które nie spełniają specyfikacji analitycznej | Nadmierne przenoszenie ELM lub pominięcie płukania powodujące obciążenie GC w zakresie pokrycia | Przed pobraniem nieudanej próbki (próbek) w następnej partii przygotowania biblioteki i przebiegu należy zapoznać się z Porady i techniki na stronie 14 i Instrukcja użytkowania na stronie 17 . |
| Niespełnianie wymagań kontroli jakości biblioteki na podstawie zanieczyszczenia co najmniej jednej próbki w przebiegu, ale nie wszystkich próbek | Wynik kontroli jakości biblioteki próbek podsumowania to NIEPOWODZENIE przypadku jednej lub kilku próbek, ale nie dla wszystkich próbek w raporcie skonsolidowanym z powodu szacowanego zanieczyszczenia próbek, które nie spełniało wymagań specyfikacji analitycznej | Zanieczyszczona próbka (próbki) lub nie zmieniono końcówki podczas przygotowywania próbki lub biblioteki | Przed pobraniem nieudanej próbki (próbek) w następnej partii przygotowania biblioteki i przebiegu należy zapoznać się z Porady i techniki na stronie 14 i Instrukcja użytkowania na stronie 17 . W przypadku powtarzającego się niepowodzenia dotyczącego tej samej próbki, próbka DNA może być zanieczyszczona. |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|---|--|--|--|
| Niepowodzenie kontroli jakości biblioteki na podstawie zanieczyszczenia wszystkich próbek | Wynik kontroli jakości biblioteki próbek podsumowania jest zgłaszany jako NIEPOWODZENIE w przypadku wszystkich próbek w raporcie skonsolidowanym ze względu na szacowane zanieczyszczenie próbek, które nie spełniania wymagań specyfikacji analitycznej | Zanieczyszczony odczynnik lub nie zmieniono końcówki podczas rozcieńczenia próbki lub przygotowywania biblioteki | Należy zapoznać się z Porady i techniki na stronie 14 , aby uniknąć zanieczyszczenia. Umieścić ponownie w kolejce próbki niespełniające wymagań w następnej partii przygotowania biblioteki i wykonać przebieg używając świeżego rozcieńczenia próbki i zestawu do przygotowania biblioteki. |
| Podsumowanie wyników ploidalność ND | Podsumowanie wyników ploidalności zgłoszonych jako ND (nieokreślone) w raporcie skonsolidowanym | Płeć została podana jako nieznana podczas tworzenia przebiegu | Potwierdzić, że „Podana ploidalność chromosomu płci” w raporcie skonsolidowanym była „Nieznana”. Zaleca się, aby w danych próbki podać płeć jako „męska” lub „żeńska”, jeśli jest znana podczas tworzenia przebiegu. |
| | | DRAGEN zgłosił wynik ploidalności płci inny niż XX lub XY, taki jak X0 lub XXY | Przejrzeć wynik „szacowany wynik ploidalności” za pośrednictwem DRAGEN w raporcie skonsolidowanym. |

| Rodzaj problemu | Obserwacja | Możliwa przyczyna | Zalecane działanie |
|---|--|--------------------------------------|--|
| Wynik podsumowania ploidalności NIEZGODNY | Podsumowanie wyników ploidalności zgłoszone jako NIEZGODNE w raporcie skonsolidowanym. | Potencjalny problem z zamianą próbki | Sprawdzić, czy dane próbki wprowadzone podczas tworzenia przebiegu były poprawne. Jeśli dane są nieprawidłowe, należy ponownie umieścić w kolejce analizę ze zmianami. Jeśli są prawidłowe i podejrzewa się problem z zamianą próbek, zaleca się ponowne umieszczenie w kolejce próbki/próbek oznaczonych jako NIEZGODNE w następnym przebiegu przygotowania biblioteki i przeprowadzenie przebiegu, aby uniknąć zgłaszania nieprawidłowych wyników. Oprogramowanie próbki nie wymusza niespełniania wymagań przez próbkę z wynikiem analizy ploidalności oznaczonym jako NIEZGODNY. |

Piśmiennictwo

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* . 2003;34(4):460-463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med* . 2020;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med* . 2010;12(3):145-52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68–74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. STRipy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat* . 2022;43(7):859-868. doi: 10.1002/humu.24382. Pub. w Internecie 21 kwietnia 2022 r. PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol* . 2022;21(3):234-245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet* . 2010;18(11):1188-95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Pub. w Internecie 24 lutego 2010 r. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 1998 r. 28 października [aktualizacja: 16 listopada 2023 r.]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., wyd. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry* . 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Pub. w Internecie 20 października 2015 r. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* . 2011;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Pub. w Internecie 21 września 2011 r. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*. 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet* . 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molekularne tło choroby EPM1-Unverricht-Lundborg. *Epilepsia* . 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Pub. w Internecie 19 listopada 2007 r. PMID: 18028412.

14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(12):1203-8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Pub. w Internecie 30 maja 2012 r. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.
15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Pub. w Internecie 17 września 2014 r. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics*. 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg Apz, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med*. 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200. Pub. w Internecie 19 września 2012 r. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet*. 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Erratum w: *Nat Genet* 2002 styczeń;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet*. 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Pub. w Internecie 16 czerwca 2011 r. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Pub. w Internecie 3 kwietnia 2012 r. PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet*. 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Pub. w Internecie 22 lipca 2019 r. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet*. 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Pub. w Internecie 22 lipca 2019 r. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Pub. w Internecie 17 marca 2003. PMID: 12640453.

Załącznik A

Zestaw indeksów S4 1

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| A01 | UDP0037 | TGTAATCGAC | GATCACCGCG |
| B01 | UDP0038 | GTGCAGACAG | TACCATCCGT |
| C01 | UDP0039 | CAATCGGCTG | GCTGTAGGAA |
| D01 | UDP0040 | TATGTAGTCA | CGACTAATG |
| E01 | UDP0041 | ACTCGGCAAT | GACAAC TGAA |
| F01 | UDP0042 | GTCTAATGGC | AGTGGTCAGG |
| G01 | UDP0043 | CCATCTCGCC | TTCTATGGTT |
| H01 | UDP0044 | CTGCGAGCCA | AATCCGGCCA |
| A02 | UDP0065 | TAATGTGTCT | GTAAGGCATA |
| B02 | UDP0066 | ATACCAACGC | AATTGCTGCG |
| C02 | UDP0067 | AGGATGTGCT | TTACAATTCC |
| D02 | UDP0068 | CACGGAACAA | AACCTAGCAC |
| E02 | UDP0069 | TGGAGTACTT | TCTGTGTGGA |
| F02 | UDP0070 | GTATTGACGT | GGAATTCCAA |
| G02 | UDP0071 | CTTGTACACC | AAGCGCGCTT |
| H02 | UDP0072 | ACACAGGTGG | TGAGCGTTGT |

Zestaw indeksów S4 2

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| A03 | UDP0081 | TGTCGCTGGT | TCGTCTGACT |
| B03 | UDP0082 | ACCGTTACAA | CTCATAGCGA |
| C03 | UDP0083 | TATGCCTTAC | AGACACATTA |
| D03 | UDP0084 | ACAAGTGGAC | GCGGATGTT |
| E03 | UDP0085 | TGGTACCTAA | CATGAGTACT |

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| F03 | UDP0086 | TTGGAATTCC | ACGTCAATAC |
| G03 | UDP0087 | CCTCTACATG | GATACCTCCT |
| H03 | UDP0088 | GGAGCGTGTA | ATCCGTAAGT |
| A04 | UDP0089 | GTCCGTAAGC | CGTGTATCTT |
| B04 | UDP0090 | ACTTCAAGCG | GAACCATGAA |
| C04 | UDP0091 | TCAGAAGGCG | GGCCATCATA |
| D04 | UDP0092 | GCGTTGGTAT | ACATACTTCC |
| E04 | UDP0093 | ACATATCCAG | TATGTGCAAT |
| F04 | UDP0094 | TCATAGATTG | GATTAAGGTG |
| G04 | UDP0095 | GTATTCCACC | ATGTAGACAA |
| H04 | UDP0096 | CCTCCGTCCA | CACATCGGTG |

Zestaw indeksów S2 1

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| A01 | UDP0037 | TGTAATCGAC | GATCACCGCG |
| B01 | UDP0038 | GTGCAGACAG | TACCATCCGT |
| C01 | UDP0039 | CAATCGGCTG | GCTGTAGGAA |
| D01 | UDP0040 | TATGTAGTCA | CGCACTAATG |
| E01 | UDP0041 | ACTCGGCAAT | GACAACTGAA |
| F01 | UDP0042 | GTCTAATGGC | AGTGGTCAGG |

Zestaw indeksów S2 2

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| A02 | UDP0065 | TAATGTGTCT | GTAAGGCATA |
| B02 | UDP0066 | ATACCAACGC | AATTGCTGCG |
| C02 | UDP0067 | AGGATGTGCT | TTACAATTCC |
| D02 | UDP0068 | CACGGAACAA | AACCTAGCAC |
| E02 | UDP0069 | TGGAGTACTT | TCTGTGTGGA |
| F02 | UDP0070 | GTATTGACGT | GGAATTCCAA |

Zestaw indeksów S2 3

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| A03 | UDP0081 | TGTCGCTGGT | TCGTCTGACT |
| B03 | UDP0082 | ACCGTTACAA | CTCATAGCGA |
| C03 | UDP0083 | TATGCCTTAC | AGACACATTA |
| D03 | UDP0084 | ACAAGTGGAC | GCGCGATGTT |
| E03 | UDP0085 | TGGTACCTAA | CATGAGTACT |
| F03 | UDP0086 | TTGGAATTCC | ACGTCAATAC |

Zestaw indeksów S2 4

| Identyfikator studzienki płytki indeksowej | Nazwa indeksu | Nukleotydy i7 | Nukleotydy i5 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| A04 | UDP0089 | GTCCGTAAGC | CGTGTATCTT |
| B04 | UDP0090 | ACTTCAAGCG | GAACCATGAA |
| C04 | UDP0091 | TCAGAAGGCG | GGCCATCATA |
| D04 | UDP0092 | GCGTTGGTAT | ACATACTTCC |
| E04 | UDP0093 | ACATATCCAG | TATGTGCAAT |
| F04 | UDP0094 | TCATAGATTG | GATTAAGGTG |

Załącznik B

Dodatkowe obliczenia dla opcji 1: ilość wejściowa DNA 280 ng dla metod kwantyfikacji szerokiego zakresu Quant i Qubit

Obliczanie granic stężenia dla stężenia podstawowego roztworu DNA od 11,2 do 154,0 ng/μl:

Minimalne stężenie jest oparte na ilości wejściowej DNA 280,0 ng / objętości 25,0 μl = 11,2 ng/μl.

Przy minimalnej objętości pipetowania wynoszącej 2,0 μl, maksymalne stężenie wynosi 280 ng*1,1 (nadwyżka 10%) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, w całkowitej objętości wynoszącej 27,5 μl.

Przykładowe obliczenia przy ilości wejściowej DNA 280,0 ng

Przepracowany przykład stężenia podstawowego roztworu DNA = 95,0 ng/μl:

- Objętość podstawowego roztworu DNA (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1 / 95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, zaokrągla do 3,24 μl w celu dokładnego pipetowania za pomocą P-10.
- Całkowita objętość rozcieńczonego DNA jest stała i wynosi 27,5 μl.
- Objętość RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, zaokrągla do 24,3 μl dla dokładnego pipetowania z P-200.

Przepracowany przykład stężenia podstawowego roztworu DNA = 308,0 ng/μl:

- Objętość podstawowego roztworu DNA (μl) jest stała na poziomie 2,0 μl
- Całkowita objętość rozcieńczonego DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- Objętość RSB (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Dodatkowe obliczenia dla opcji 2: ilość wejściowa DNA 350 ng dla Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method

Obliczanie granic stężenia dla stężeń podstawowego roztworu DNA od 14,0 do 192,5 ng/μl:

Stężenie minimalne opiera się na wejściu DNA 350,0 ng / objętości 25,0 μl = 14,0 ng/μl.

Przy minimalnej objętości pipetowania wynoszącej 2,0 μl maksymalne stężenie wynosi 350 ng*1,1 (nadwyżka 10%) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Przykładowe obliczenia z ilością wejściową DNA 350 ng

Przepracowany przykład stężenia podstawowego roztworu DNA = 118,75 ng/μl:

- Objętość podstawowego roztworu DNA (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1 / 118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, zaokrągla do 3,24 μl, zapewniając dokładne pipetowanie za pomocą P-10
- Całkowita objętość rozcieńczonego DNA jest stała i wynosi 27,5 μl.
- Objętość RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, zaokrągla do 24,3 μl dla dokładnego pipetowania z P-200.

Przepracowany przykład stężenia podstawowego roztworu DNA = 308,0 ng/μl:

- Objętość podstawowego roztworu DNA (μl) jest stała na poziomie 2,0 μl
- Całkowita objętość rozcieńczonego DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Objętość RSB (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Historia wersji

| Dokument | Data | Opis zmiany |
|--|---------------------|--|
| Nr dokumentu: 200050132, wer. 00.1 | Maj 2024 r. | Skorygowana objętość wejściowa dla Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method. |
| Nr dokumentu: 200050132 wer. 00 | Kwiecień 2024 r. | Pierwsze wydanie. |

Ulotka dołączona do opakowania

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc., a także jej podmiotów zależnych („Illumina”), i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane w innych celach i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

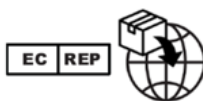
© 2024 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć pod adresem www.illumina.com/company/legal.html.

Dane do kontaktu



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponsor w Australii

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

Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w legendzie symboli dostępnej na stronie support.illumina.com, na karcie *Documentation* (Dokumentacja) danego zestawu.