

Prospect

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO.

Utilizarea preconizată

TruSight™ Whole Genome este un dispozitiv calitativ de diagnosticare *in vitro* destinat secvențierii întregului genom și detectării variantelor de nucleotide unice, introducerii/deleției, variantelor de numere de copii, exploatărilor cu homozigotate, expansiunilor repetate în tandem scurt și variațiilor mitocondriale ale ADN-ului genomic uman extras din sânge.

TruSight Whole Genome include TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes și software-ul TruSight Whole Genome Analysis Application. Dispozitivul este destinat utilizării împreună cu aplicații de linie germinală compatibile în aval, pentru a dezvolta analize de diagnosticare *in vitro* și de către personal calificat de laborator și dezvoltatori de analize.

TruSight Whole Genome este destinat utilizării cu NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Rezumat și explicație

TruSight Whole Genome este o analiză de secvențiere de ultimă generație care utilizează pregătirea bibliotecii fără PCR bazată pe etichetare, începând de la ADN-ul genomic (ADNg) extras din sânge uman integral periferic și secvențierea și analiza primară pe Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Analiza secundară este efectuată cu software-ul TruSight Whole Genome Analysis Application pe Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx inclus și necesar și include demultiplexarea, alinierea la genomul de referință uman GrCh38/hg38 și definirea variantelor, precum și adnotarea și aplicarea specificațiilor metrice pentru controlul calității (QC) în [Tabelul 1](#) pentru a asigura performanța analitică. Leșurile analizei includ rapoarte CC ale rulării și ale probei și fișiere în format de definire a variantei genomului (VCF) pentru utilizarea cu software-ul compatibil de analiză și raportare terțiară în aval.

TruSight Whole Genome evaluează în sens larg variantele genomice din toate regiunile de codificare și necodificare ale genomului uman. Evaluarea variantelor include detectarea variantelor mici, a variantelor cu numere de copiere (CNV), a expansiunilor cu homozigotate (ROH) și a expansiunilor cu repetare în tandem scurt (STR). În plus, TruSight Whole Genome detectează absența alelei SMN1 c.840C (NM_000344.3:c.840C>T), care ar putea indica deleția genei SMN1 sau conversia genei SMN1/SMN2.^{1,2} Pierderea bialelică a alelei SMN1 c.840C este responsabilă pentru aproximativ 95% din cazurile de atrofie musculară spinală (AMS).³

[Tabelul 2](#) furnizează informații despre tipurile de variante validate cu TruSight Whole Genome.

Tabelul 1 TruSight Whole Genome Specificații privind măsurătorile de calitate

Tip de rezultat	Metrică	Specificații
Controlul calității rulării secvențierii	Total % \geq Q30	\geq 85,0
Controlul calității FASTQ	Randament per probă (bps)	\geq 90.000.000.000
Controlul calității bibliotecă de probe	Acoperire autozomală medie	\geq 35,0
	Procentajul autozomilor cu acoperire mai mare de 20X	\geq 93,94
	Acoperire normalizată la compartimente GC de la 60% la 79%	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Acoperire normalizată la compartimente GC de la 20% la 39%	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Acoperire mitocondrială medie	\geq 500,0
	Procentul bazelor Q30	\geq 85,0
	Contaminare estimată a probei	\leq 0,005

Tabelul 2 Variante detectate validate cu TruSight Whole Genome

Tip de variantă	Detectare variantă validată
Variante mici	Variante unice de nucleotide (SNV), inserții/deleții scurte (1–31 bp)
Copiere variante număr (CNV)	\geq 10 kb câștiguri și pierderi
Rulări de homozigitate (ROH)	\geq 500 kb
SNV-uri mitocondriale	% heteroplasmie dacă \geq 4,75%
Extindere scurte în tandem cu repetare (STR)	Loci vizați (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B și BP)
Varianta SMN1	NM_000344.3:c.840C/T

Principiile procedurii

TruSight Whole Genome este destinat pregătirii bibliotecilor fără PCR pentru a produce date de secvențiere a întregului genom uman. Analiza începe cu pregătirea bibliotecilor din ADN-ul genomic cuantificat extras din sânge integral uman periferic, include secvențierea și analiza pe NovaSeq 6000Dx Instrument utilizând TruSight Whole Genome Analysis Application și se termină cu definirea și adnotarea variantei.

Procedura analizei TruSight Whole Genome constă din următoarele etape:

- **Planificarea lotului și crearea rulării** — Se recomandă insistent planificarea lotului și rulările înainte de începerea pregătirii bibliotecii. Într-un lot de pregătire a bibliotecilor pot fi preparate până la 24 de biblioteci de probe. Pe baza numărului de probe, pot fi utilizate diferite configurații de celule de flux (6-plex pe S2 și 16-plex pe S4). ID-ul eprubetelor din bibliotecă, numele probelor și indexarea corespunzătoare sunt înregistrate în timpul planificării rulării și creării rulării. Pentru mai multe informații despre crearea rulării, consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931). Urmați lotul planificat în timpul executării fluxului de lucru pentru pregătirea bibliotecii.
- **Pregătirea pentru protocol** — Unii reactivi sunt congelați și trebuie aduși la temperatura camerei. Datorită fluxului de lucru scurt, este posibilă finalizarea pregătirii și începerea secvențierii în aceeași zi. Astfel, consumabilele de secvențiere pentru executările planificate pot fi, de asemenea, decongelate în timpul acestui pas. Probele de ADN genomic cuantificate sunt decongelate și diluate pentru o introducere optimizată a ADN-ului.
- **Pregătirea bibliotecii**
 - **Etichetarea ADN-ului genomic** — Utilizează Bead-Linked Transposomes (transpozomi legați de microbale) fără PCR (BLT-PF) pentru a eticheta introducerea ADN-ului. În timpul etichetării, ADNg este fragmentat, marcat cu adaptoare și imobilizat pe suprafața bilelor magnetice BLT-PF.
 - **Curățarea după etichetare** — Curăță ADN-ul etichetat cu adaptor pe BLT-PF și îndepărtează soluția tampon de oprire pentru a se pregăti pentru indicii de ligatură.
 - **Indicii de ligatură** — Adaugă indici unici duali în biblioteci pentru a permite multiplexarea. Efectuează extinderea spațiului gol și elimină bibliotecile ADN cu o singură catenă de pe bile.
 - **Bibliotecile de selectare a dimensiunii și de curățare** — O procedură de purificare a bilelor cu selectare a dimensiunii pe două fețe îndepărtează fragmentele prea mici și prea mari pentru a viza o lungime mediană a fragmentului de aproximativ 450 bp, intervalul ~360 până la 550 bp.
 - **Biblioteci grupate și denaturate** — Funcția de autonormalizare a BLT-PF permite gruparea după volum fără qPCR sau altă normalizare. Volumul specificat din fiecare bibliotecă este grupat conform planului pentru fiecare rulare și denaturat cu 0,2N NaOH (HP3 diluat). Gruparea denaturată este apoi transferată în Eprubeta din Bibliotecă NovaSeq 6000Dx cu ID-ul care corespunde rulării planificate.
- **Secvențiere și analiză** — Consumabilele din configurația S2 și/sau S4 sunt încărcate în NovaSeq 6000Dx Instrument, inclusiv Eprubeta(ele) din bibliotecă NovaSeq 6000Dx asociate cu bibliotecile grupate. La încărcare, ID-ul Eprubetei din bibliotecă este scanat și, dacă este introdus în timpul planificării rulării, este utilizat pentru a selecta rulare planificată corespunzătoare. În caz contrar, rulare planificată asociată trebuie selectată manual.

Bibliotecile grupate sunt acumulate într-un cluster pe o celulă de tip flow cell, iar apoi secvențiate prin reacție chimică de sinteză (SBS) pe NovaSeq 6000Dx. Chimia SBS folosește o metodă cu terminator reversibil pentru a detecta bazele mononucleotidice etichetate fluorescent, pe măsură ce acestea sunt încorporate în catenele de ADN în creștere.

Real-Time Analysis (RTA) efectuează analiza primară care include definirea bazelor și atribuirea unui scor de calitate fiecărei baze pentru fiecare definire a bazei. Datele de analiză primară sunt transferate automat pe serverul Illumina DRAGEN.

Demultiplexarea și analiza DRAGEN se efectuează automat utilizând TruSight Whole Genome Analysis Application. Ca parte a acestei analize, fiecare rulare și bibliotecă de probe sunt revizuite din punct de vedere al validității utilizând metricile analitice descrise în [Controlale de calitate la pagina 32](#), iar rezultatele sunt furnizate în rapoartele consolidate și individuale ale probelor. Pentru bibliotecile de probe valide, sunt generate fișiere cu format de definire a variantei de genom adnotat (VCF). Pentru mai multe informații despre fluxul de lucru al analizei, consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931).

Limitările procedurii

- A se utiliza la diagnosticarea *in vitro*.
- TruSight Whole Genome este compatibil cu ADN-ul genomic derivat din sânge integral periferic uman.
- Analiza nu include reactivi pentru extracția sau cuantificarea ADN-ului. Rezultatele testelor analitice, inclusiv [Substanțe care interferează la pagina 36](#) au fost obținute cu sânge integral folosind truse reprezentative de extracție a ADN-ului și truse de cuantificare a ADN-ului. Toate testele de diagnosticare dezvoltate pentru utilizarea cu TruSight Whole Genome necesită validarea completă a tuturor aspectelor de performanță cu seturile de extracție și cuantificare a ADN-ului alese.
- Analiza a fost configurată și testată pentru plexitatea probei și seturile de indexuri indicate în tabelul următor.

Dimensiune lot pregătire bibliotecă	Plexitate	Executare configurare	Indexare
6, 12, 18 sau 24 de probe	6 plexuri	1-4 rulări S2	S2 Setarea de la 1 la 4
16 probe	16 plexuri	1 rulare S4	S4 Set 1 sau 2
22 de probe	16-plex + 6-plex	1 rulare S4 + 1 rulare S2	S4 Set 1 sau 2, S2 Set 1 la 4 (nu este utilizat pentru S4)

- Analiza nu impune urmărirea pozitivă a probelor. În timp ce rezultatul sumar al CC pentru ploidie raportat de software poate fi utilizat opțional pentru a identifica schimburile de probe, acesta nu va identifica Masculin inversat cu Masculin sau Feminin inversat cu Feminin.
- Analiza oferă validarea numai până la ieșirea fișierelor VCF genom. Toate testele de diagnosticare dezvoltate pentru utilizarea cu TruSight Whole Genome necesită validarea completă a tuturor aspectelor de performanță cu aplicațiile din aval alese.
- Analiza nu raportează definiții de variante pentru probe care nu trec controlul calității.
- Analiza definește niveluri de încredere ridicate numai pentru VNS și inserții/deleții de 1–5 bp datorită criteriilor stricte utilizate pentru definirea unui context genomic ca nivel de încredere ridicat pentru un tip de variantă dat în [Determinarea nivelului de încredere a variantelor mici la pagina 37](#).

- Analiza este concepută pentru a evalua CNV în întregul genom raportabil, indiferent de contextul genomic, și exclude regiunile cu caracteristici care reflectă limitările genomului de referință, cum ar fi centromerii, telomerii și separarea CNV frecvente la populații.
- Performanța analizei nu a fost evaluată pentru variantele cu număr de copii sub 10 kb.
- Analiza nu raportează translocări, inversări sau rearanjări echilibrate.
- Performanța testului nu a fost evaluată pentru inserțiile sau delețiile ADN mitocondrial (ADNmt).
- Analiza raportează numai rezultatele pentru locii STR enumerați în [Tabelul 2](#). Atunci când lungimile reale de extindere STR depășesc aproximativ 135 bp, lungimea observată va fi adesea o subestimare a lungimii reale din cauza limitărilor tehnice ale citirilor scurte, acest efect fiind și mai pronunțat pentru FMR1. Odată ce lungimea reală STR depășește lungimea mediană a fragmentului (~330 bp), estimarea lungimii STR atinge un platou.
- Analiza nu raportează numărul de copii SMN1 sau SMN2.
- Analiza nu face afirmații cu privire la patogenitatea variantelor detectate.

Componentele produsului

TruSight Whole Genome este alcătuit din următoarele:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (nr. catalog 20093209) și
- TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. catalog 20106190, instalat de personal instruit Illumina)

Reactivi

Reactivi furnizați

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Nume reactiv	Cantitate	Volum de umplere	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads (bilele magnetice de streptavidină sunt legate cu transpozomi în soluție apoasă tamponată.	între -25 °C și -15 °C

Nume reactiv	Cantitate	Volum de umplere	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligază, polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată.	între -25 °C și -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	Soluție de hidroxid de sodiu 2N (NaOH).	între -25 °C și -15 °C
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Soluție apoasă tamponată care conține sare de magneziu și dimetilformamidă.	între -25 °C și -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Nume reactiv	Cantitate	Volum de umplere	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Soluție apoasă tamponată cu detergent și sare.	între 15 °C și 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Soluție apoasă tamponată.	între 15 °C și 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată.	între 15 °C și 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Soluție de detergent în apă.	între 15 °C și 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Soluție Tris-HCl.	între 15 °C și 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Nume reactiv	Cantitate	Volum de umplere	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Adaptoare cu index dublu (UD) unice dispuse în placă.	între -25 °C și -15 °C

Consumabile necesare, nefurnizate

- Etanol, 100% (tărie normală 200), adecvat pentru biologie moleculară
- Certified RNase/DNase-free water (Apă certificată fără RNază/DNază)
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cicluri) (nr. catalog 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cicluri) (nr. catalog 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (nr. catalog 20062292)

- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (nr. catalog 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (nr. catalog 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (nr. catalog 20062291)

Depozitare și manipulare

- Temperatura camerei este definită ca fiind intervalul dintre 15°C și 30°C.
- Dacă orice ambalaj sau conținut al componentelor TruSight Whole Genome Dx Library Prep este deteriorat sau compromis, contactați departamentul Asistență clienți Illumina.
- Reactivii sunt stabili când sunt depozitați conform indicațiilor până la data de valabilitate specificată pe etichetele seturilor. Pentru condițiile de depozitare, consultați [Reactivi furnizați la pagina 5](#). Depozitați componentele testului la temperatura specificată și nu utilizați reactivi expirați. Nu interschimbați componentele între loturi de seturi diferite. Loturile de seturi sunt identificate pe etichetele de pe cutie.
- Modificările aspectului fizic al reactivilor pot indica deteriorarea materialelor. Dacă apar modificări ale aspectului reactivilor (de exemplu, schimbarea evidentă a culorii sau turbiditatea reactivilor), nu-i utilizați. Dacă se observă precipitarea pentru ST2, încălziți la 37 °C timp de 10 minute, apoi amestecați până la dizolvarea precipitatelor.
- Stabilitatea TruSight Whole Genome Dx Library Prep a fost evaluată, fiindu-i evaluate și demonstrate performanțele pentru până la patru utilizări ale eprubetelor congelate când sunt congelate între utilizări.

Echipamente și materiale

Echipamente necesare, nefurnizate

Verificați starea calibrării echipamentului înainte de a începe analiza.

Echipament	Furnizor
Vortexer cu capacitate de 3000 rpm, cu fund plat sau cupă	Furnizor general pentru laboratoare
Incubator pentru microprobe calibrat pentru a asigura precizia temperaturii de ± 2 °C	SciGene, nr. catalog 1057-30-O (sau echivalent)
Insertie pentru incubator de microspecimene pentru plăci MIDI cu 96 de godeuri	Illumina, nr. catalog BD-60-601
Microcentrifugă	Furnizor general pentru laboratoare
Centrifugă cu microplăci cu 96 de godeuri	Furnizor general pentru laboratoare

Echipament	Furnizor
Placă vibratoare cu următoarele specificații: <ul style="list-style-type: none"> • Poate vibra la 1800 rpm • Constantă orbită de amestecare 2 mm • Acuratețea amestecării de ± 25 rpm 	VWR, nr. catalog 1808-0506 (sau echivalent)
Pană sau rolă de sigilare	Furnizor general pentru laboratoare
Suport magnetic cu următoarele specificații: <ul style="list-style-type: none"> • Conceput pentru precipitare/separare cu bile paramagnetice • Magneți pe laterala, nu pe fundul suportului • Pentru plăci MIDI cu 96 godeuri 	Thermo Fisher Scientific, nr. piesă AM10027 (sau echivalent)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, nr. catalog 20068232
Pipete de precizie (canal unic): <ul style="list-style-type: none"> • 10 μl • 20 μl • 200 μl • 1000 μl 	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete de precizie (8 canale): <ul style="list-style-type: none"> • 20 μl • 200 μl 	
Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate regulat și precis în interval de 5% din volumul indicat.	
Dispozitiv pentru pipetă	Furnizor general pentru laboratoare

Materiale obligatorii, nefurnizate

Asigurați-vă că aveți materialele necesare înainte de a începe protocolul.

Protocolul a fost optimizat și validat utilizând articolele enumerate. Performanța comparabilă nu este garantată atunci când se utilizează materiale alternative.

Materiale	Furnizor
Pipete serologice de 5 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete serologice de 10 ml	Furnizor general pentru laboratoare

Materiale	Furnizor
Sigilii adezive pentru plăci cu 96 de godeuri cu următoarele specificații: <ul style="list-style-type: none"> • Poliester transparent optic, ușor de dezlipit • Adeziv puternic, rezistent la multiple variații de temperatură de la -40 °C până la 110 °C. • Fără DNază/RNază 	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete Microcentrifuge, fără nuclează (1,5, 1,7 sau 2,0 ml, cu excepția cazului în care se specifică 0,5 ml)	Furnizor general pentru laboratoare
Colectoare de reactivi fără nuclează, de 50 ml sau echivalent (PVC, canal de unică folosință)	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete conice de 15 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete conice de 50 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de pipetă de 20 µl, rezistente la formarea de aerosoli	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de pipetă de 200 µl, rezistente la formarea de aerosoli	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de pipetă de 1000 µl, rezistente la formarea de aerosoli	Furnizor general pentru laboratoare
Plăci de depozitare cu 96 de godeuri, 0,8 ml (plăci MIDI)	Thermo Fisher Scientific, nr. piesă AB-0859 (sau echivalent)
Plăci PCR cu 96 de godeuri, 0,2 ml (polipropilenă care nu conține RNază/DNază, legare ușoară)	Furnizor general pentru laboratoare
Găleată pentru gheață și gheață	Nu se aplică
Probe de ADN genomic cuantificate	Nu se aplică

Colectarea, transportul și depozitarea probei

ATENȚIE

Manevrați toate probele ca și cum ar fi agenți cu potențial infecțios.

- Respectați procedurile de siguranță, inclusiv utilizarea EIP, atunci când recoltați, transportați, depozitați și prelucrați probe de sânge uman.
- Transportarea sângelui integral trebuie să fie în conformitate cu reglementările naționale, federale, statale și locale privind transportul de agenți etiologici.

- Recoltați 2–5 ml de sânge integral periferic în eprubete EDTA și depozitați la 2 °C până la 8 °C timp de până la cinci săptămâni înainte de extracție.
- Nu s-a observat niciun efect advers asupra performanței testului în cazul specimenelor de sânge integral cu valori crescute ale bilirubinei, hemoglobinei, trigliceridelor, biotinei sau EDTA. Consultați Substanțe care interferează.
- TruSight Whole Genome este compatibil cu trusele de extracție și protocoalele disponibile în comerț care sunt adecvate pentru utilizarea în Next Generation Sequencing (NGS). Consultați [Evaluarea metodei de extracție a ADN-ului la pagina 35](#).
- TruSight Whole Genome este compatibil cu ADN-ul eluat într-o soluție tampon Tris care conține ≤ 10 mM EDTA, precum 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Se recomandă eluția și păstrarea ADN-ului în TE. Pentru stabilitate, evitați depozitarea în apă.

Recomandări privind introducerea de ADN

- Înainte de a începe testul TruSight Whole Genome, cuantificați ADN-ul genomic extras din sângele integral folosind orice metodă de cuantificare fluorometrică care utilizează coloranți de legare a acidului nucleic. Se recomandă ca ADNg pentru probele destinate pentru un anumit lot de pregătire a bibliotecii și executarea secvențierii să fie cuantificate împreună pentru a elimina variabilitatea de la lot la lot, atunci când este posibil, sau să se utilizeze controale de proces pentru a asigura o variabilitate de cuantificare a ADN-ului de ≤ 25% din lot la lot.
- Evitați pipetarea volumelor mici de probă (< 2 µl) pentru a asigura o cuantificare și o introducere precise ale ADN-ului.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep necesită suficient ADN pentru a satura bilele de BLT-PF pentru autonormalizarea eficientă a randamentelor bibliotecii și performanță optimă. Din cauza variației rezultatelor obținute prin diferite metode de cuantificare, următorul tabel furnizează datele de intrare a ADN-ului recomandate pentru trei metode de cuantificare pentru a asigura performanța optimă a testului. Utilizarea altor metode de cuantificare poate necesita optimizare. Consultați [Sensibilitate introducere ADN la pagina 35](#).

Metodă Quant	Introducere ADN (ng) țintă	Concentrația minimă a stocului de ADN
Kit analiză Quant-iT PicoGreen ADNds	280	11,2 ng/µl
Trusă de analiză cu interval larg (BR) Qubit ADNds	280	11,2 ng/µl
Trusă de dozare AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA	350	14 ng/µL

Recomandări privind competența

Competența operatorului și implementarea cu succes a testului pot fi evaluate prin efectuarea fluxului de lucru complet o singură dată, în conformitate cu instrucțiunile de utilizare. Acest flux de lucru poate fi efectuat fie cu o singură pregătire a bibliotecii de 6 probe și cu o execuție de secvențiere utilizând o celulă de flux S2, fie cu o singură pregătire a bibliotecii de 16 probe și cu o execuție de secvențiere utilizând o celulă de flux S4. Succesul este indicat prin depășirea parametrilor QC ai rulării și bibliotecii înregistrați în ieșirea Raportului consolidat de către software-ul TruSight Whole Genome Analysis Application. Consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931).

illumina recomandă includerea probelor de ADN genomic extrase din sânge integral periferic care îndeplinesc criteriile de calificare ale concentrației și volumului stocului de ADN pentru a demonstra integrarea cu succes a testului în procesele de laborator din amonte, cum ar fi recoltarea și depozitarea probelor și procedurile de extragere și cuantificare a ADN-ului. Pot fi utilizate, de asemenea, probe de referință ADN genomic disponibile în comerț, derivate de la un singur donator uman, cum ar fi NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium).

Dacă apar probleme, consultați secțiunea [Depanare la pagina 65](#) pentru acțiunile recomandate și contactați departamentul de asistență tehnică illumina.

Avertizări și precauții

- **Unele componente ale testului conțin substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile.** Pentru fișele cu date de securitate (SDS), vizitați support.illumina.com/sds.html.
- Raportați imediat orice incidente grave în legătură cu acest produs către illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și pacientul.
- Manipulați toate speciimenele ca și când ar fi potențial infecțioase.
- Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați speciimene și reactivi pentru testare. După ce manipulați speciimene și reactivi pentru teste, spălați-vă temeinic pe mâini.
- Această analiză conține polietilenglicol. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii.
- Această analiză conține hidroxid de sodiu. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii.

- Procedurile de pregătire a bibliotecii necesită un mediu fără ARNază/ADNază. Decontaminați temeinic zonele de lucru cu soluție de curățare inhibitoare de ARNază/ADNază.
- Utilizați eprubete de microcentrifugă, plăci, vârfuri de pipetă și colectoare fără nuclează.
- Utilizați echipamente calibrate pe întreaga durată a analizei. Calibrați echipamentele la vitezele, temperaturile și volumele specificate în prezentul protocol.
- Utilizați pipete de precizie pentru a asigura transferul precis al reactivilor și probelor. Calibrați cu regularitate, conform specificațiilor producătorului.
- Asigurați-vă că utilizați echipamentul specificat pentru analiză și că ați configurat programele conform instrucțiunilor.
- Temperaturile specificate pentru incubatorul de microprobe indică temperatura de reacție nominală, mai degrabă decât temperatura echipamentului.
- Nu interschimbați componentele setului între loturi diferite TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Loturile sunt identificate în funcție de etichetele de pe cutie.
- Se impune respectarea practicilor de laborator corecte și pentru a împiedica contaminarea cu produse PCR a reactivilor, instrumentarului și speciemenelor de ADN genomic. Contaminarea cu nuclează și PCR poate determina rezultate inexacte și nesigure.
- Pentru efectuarea optimă a analizei și pentru stocare sunt obligatorii tipurile adecvate de plăci. Asigurați-vă că ați respectat instrucțiunile de transfer al plăcilor din [Instrucțiuni de utilizare la pagina 15](#).
- Contaminarea încrucișată sau pierderea probelor poate avea loc dacă garniturile plăcii nu sunt aplicate sau îndepărtate cu atenție (consultați [Manipularea plăcilor de pregătire a bibliotecii la pagina 13](#)).
- Nerespectarea procedurilor menționate poate duce la rezultate greșite sau la reducerea semnificativă a calității bibliotecilor.
- Depozitați reactivii sau componentele de testare la temperatura specificată.
- Nu depozitați reactivii într-o unitate de depozitare fără gheață.
- Nu utilizați reactivi care au fost depozitați incorect.
- Nu utilizați nicio componentă care a depășit data de valabilitate.
- Preparați 0,2N NaOH (HP3 diluat) proaspăt în ziua utilizării și aruncați volumul rămas după utilizare.
- Preparați etanol proaspăt 80% cu RNase/DNase-free water în ziua utilizării. Etanolul poate să absoarbă umiditatea din aer, aceasta putând afecta rezultatele. Eliminați etanolul 80% după utilizare conform reglementărilor locale, regionale și/sau naționale. Utilizați etanol pentru biologie moleculară.

Note procedurale

Sfaturi și tehnici

Evitați contaminarea încrucișată

- La adăugarea sau transferul probelor, schimbați vârful între *fiecare probă*.
- Când adăugați adaptoare de index cu o pipetă multicanal, schimbați vârful între *fiecare godeu*.
- Etanșați și desigilați cu grijă plăcile pe un blat de lucru pentru a preveni contaminarea încrucișată a probelor.
- Pentru a evita contaminarea, fiecare godeu index este de unică folosință.
- Utilizați volumele indicate din canal și nu turnați volumul rămas din canal înapoi în eprubetele de depozitare, deoarece acest lucru poate cauza contaminare. Există un volum suficient pentru a susține fluxul de lucru.
- Nu cumulați biblioteci din diferite preparate.

Acuratețe pipetare

Dacă utilizați pipete multicanal, urmați recomandările de mai jos:

- Asigurați-vă că vârful de pipetă cu barieră se fixează corect și sunt adecvate mărcii și modelului de pipetă multicanal.
- Fixați vârful prin rulare, pentru a vă asigura că toate vârful s-au fixat corect.
- Aspirați asigurându-vă că volumele de lichid din fiecare vârf de pipetă sunt egale.
- Pipetați încet soluțiile vâscoase (BLT-PF,CB,ELM,TWB2).
- După distribuție, asigurați-vă că s-a distribuit lichid în fiecare vârf de pipetă.

Evitarea spumei

- Pipetați încet și răsturnați pentru a amesteca. Nu agitați ELM și TWB2.

Plăci cu indice de manipulare

- Perforați sigiliul numai pentru indicii care vor fi utilizați.
- Manipulați placa de margini și evitați atingerea sigiliului cu orice altceva decât vârful curate de pipetă.
- Nu reutilizați godeurile care au fost perforate.
- Eliminați volumul neutilizat (~30 µl) după utilizare din godeurile perforate ale plăcii indicatoare și așezați sigiliul peste godeurile perforate pentru a evita contaminarea încrucișată.
- Nu puneți sigiliul peste godeurile neutilizate, deoarece acest lucru interferează cu perforarea.

Manipularea plăcilor de pregătire a bibliotecii

- Sigilați întotdeauna placa înainte de depozitare, agitare, incubare sau centrifugare.
- Pentru sigilarea plăcii, aplicați folia adezivă pe placă cu o pană sau o rolă de sigilare.
- Asigurați-vă că marginile și godeurile sunt complet sigilate pentru a reduce riscul de contaminare încrucișată și evaporare.

- Sigilați întotdeauna placa cu folie adezivă nouă. Nu reutilizați folia adezivă.
- Puneți placa pe o suprafață plană înainte de a îndepărta sigiliul cu grijă.
- Dacă nu se specifică altfel, se pot efectua pași cu placa pe magnet sau în exteriorul magnetului.

Transferuri de plăci

- La transferul de volume între plăci, transferați volumul specificat din fiecare godeu de pe o placă sursă în godeul corespunzător al plăcii de destinație.

Canale

- Pot fi utilizate canale de reactiv acolo unde este indicat. Utilizați următoarele instrucțiuni:
 - Pregătiți canalul cu CB după turbionare. Nu este necesar să returnați CB în eprubetă și să agitați în vortex înainte de al doilea pas de adăugare a bilelor.
 - Etichetați canalele TWB2 și RSB pentru a evita confuzia.
 - Eliminați reactivii atunci când este indicat sau la sfârșitul fluxului de lucru.
- Utilizați volumul recomandat. Volumele recomandate includ un surplus de 1 ml pentru volumul rezidual din canal.
- RSB și TWB2 sunt ambalate în eprubete similare. Citiți cu atenție fiecare etichetă înainte de utilizare.

Centrifugare

- Centrifugați numai în pașii indicați în procedură pentru a consolida lichidul sau bilele de pe partea inferioară a godeului, pentru a preveni pierderea probei.

Manipularea bilelor

- Nu congelați Cleanup Beads (CB).
- Pentru spălarea bilelor:
 - Utilizați Magnetic Stand-96 pentru toate plăcile MIDI.
 - Distribuți lichidul astfel încât să nu rămână bile lipite de partea laterală a godeului.
 - Țineți placa pe suportul magnetic.
- Adăugați întotdeauna reactivi în mijlocul sau în partea inferioară a godeului fără a perturba peleta cu bile. Nu adăugați reactivi în partea superioară a godeului.
- Pipetați încet suspensiile de bile.
- Agitați bilele până când sunt bine dispersate. Culoarea lichidului trebuie să fie omogenă. Agitați când se specifică în protocol pentru a vă asigura că bilele sunt resuspendate la momentul utilizării.
- Dacă bilele nu se resuspendă, agitați din nou.
- Dacă ați aspirat bile în vârful de pipetă din greșeală, eliberați-le înapoi în placa de pe suportul magnetic și așteptați să se limpezească lichidul (2 minute).
- Depozitați în poziție verticală pentru a vă asigura că bilele sunt scufundate în soluție tampon atunci când reveniți la depozitare după utilizare.

Controale

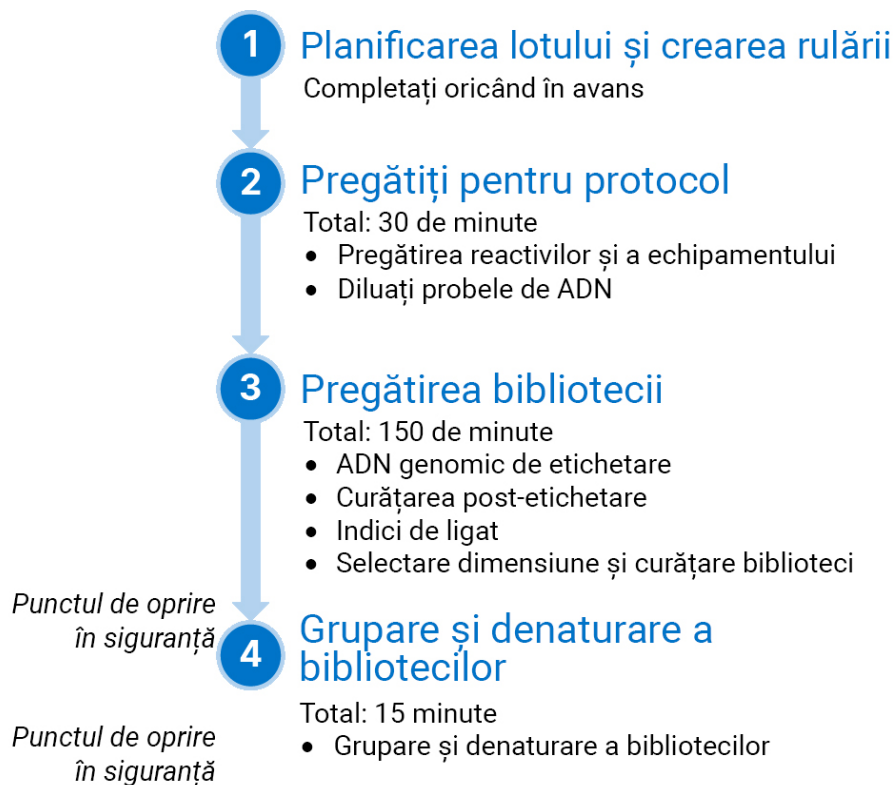
TruSight Whole Genome utilizează controale analitice integrate în software-ul TruSight Whole Genome Analysis Application pentru calificarea datelor și nu necesită utilizarea controalelor de lot externe. Consultați [Controlale de calitate la pagina 32](#) pentru mai multe informații despre specificațiile metrice.

Instrucțiuni de utilizare

Fluxul de lucru TruSight Whole Genome Dx Library Prep

Diagrama următoare ilustrează fluxul de lucru TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Punctele de oprire în siguranță sunt marcate între pași.

Dacă se oprește, readuceți reactivii rămași în flacoanele originale la temperatura de depozitare indicată în [Reactivi furnizați la pagina 5](#). Dacă continuați, treceți la secțiunea următoare a protocolului cu reactivii pregătiți.



Planificarea lotului și crearea rulării

Planificați numărul de biblioteci de probe pentru lot și indexarea și cumularea pentru ciclurile de secvențiere.

TruSight Whole Genome a fost evaluată și performanța a fost demonstrată pentru patru seturi de indici pentru celula de flux S2 ([Figura 1](#), [Tabelul 4](#)) și două seturi de indici pentru celula de flux S4 ([Figura 2](#), [Tabelul 5](#)). Software-ul aplică utilizarea seturilor de indexuri specificate. Nu amestecați și nu potriviți între seturile de indexuri specificate.

Nu este acceptată plexitatea de secvențiere în afara acestor recomandări.

Seturile de indexuri S2 și indexuri S4 acceptă împreună mărimile de lot de pregătire a bibliotecii de 6, 12, 16, 18, 22 și 24 de probe. Utilizați seturile de indexuri compatibile listate în [Tabelul 3](#) pentru fiecare dimensiune de lot de pregătire a bibliotecii.



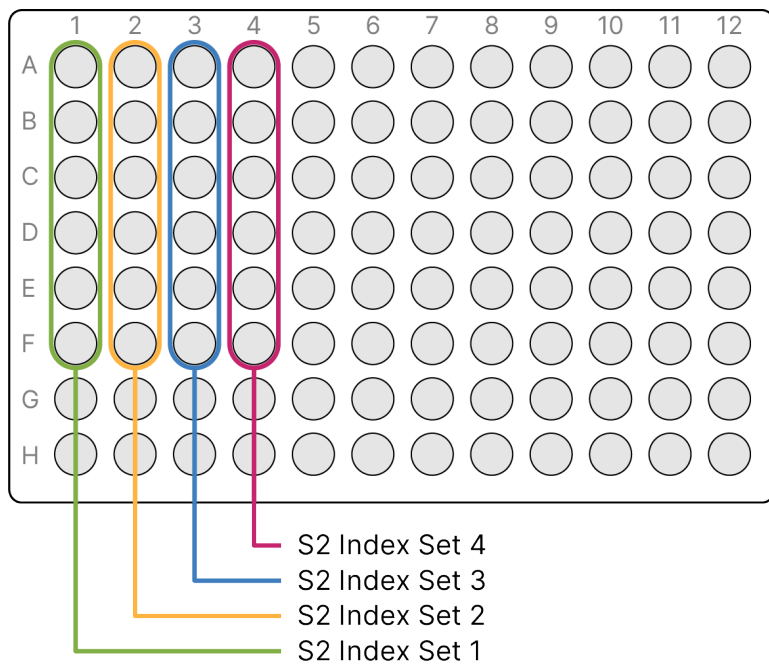
ATENȚIE

Aranjați probele pe placă folosind o orientare care corespunde indexării planificate, adică rândurile de la A la H pentru un complex de 16 sau rândurile de la A la F pentru un complex de 6. Adăugați indici utilizând o pipetă multicanal pentru a evita omiterea unui godeu sau adăugarea a două seturi de indici la o singură probă, ceea ce poate cauza lipsa rezultatelor sau, respectiv, a rezultatelor false.

Tabelul 3 Opțiuni setare index pentru lot pregătire bibliotecă

Dimensiune lot pregătire bibliotecă	Set de indexuri	Configurații Flow Cell
6 probe	Indice S2 setat la 1, 2, 3 sau 4 (alegeți orice set)	S2 x 1
12 probe	Indice S2 setat la 1, 2, 3 sau 4 (alegeți oricare 2 seturi)	S2 x 2
18 probe	Indice S2 setat la 1, 2, 3 sau 4 (alegeți oricare 3 seturi)	S2 x 3
24 de probe	Indice S2 setat la 1, 2, 3 și 4	S2 x 4
16 probe	Indice S4 setat 1 sau 2	S4 x 1
22 de probe	Indice S4 set 1 + Index S2 set 3 sau 4 Indice S4 set 2 + Indice S2 set 1 sau 2	S4 x 1 și S2 x 1

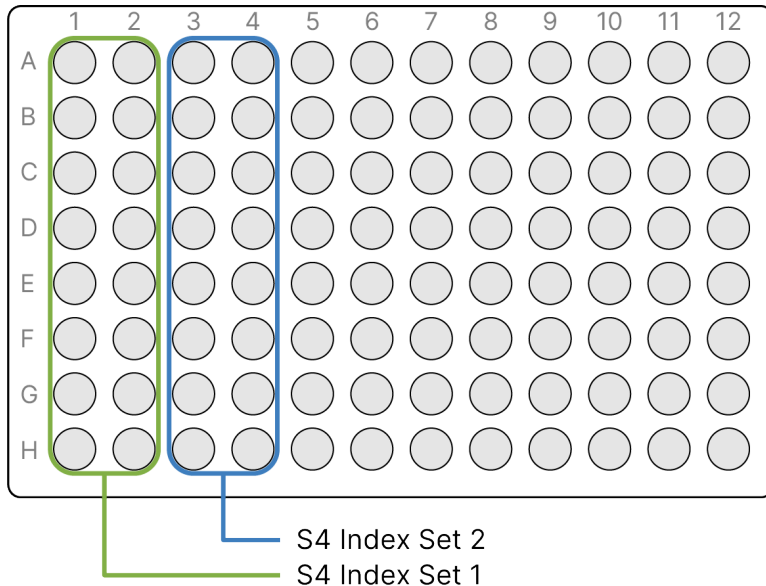
Figura 1 Dispunerea plăcii cu indice care prezintă patru seturi de indici pentru secvențierea celulei de flux S2



Tabelul 4 Seturi de indexare S2 pentru celula de flux S2

	Set index S2 1 (verde)	Set index S2 2 (galben)	Set index S2 3 (albastru)	Set index S2 4 (Magenta)
	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

Figura 2 Dispunerea plăcii cu indice care prezintă două seturi de indici pentru secvențierea celulei de flux S4



Tabelul 5 Seturi de indexare S4 pentru celula de flux S4

	Set index S4 1 (Verde)		Set index S4 2 (Albastru)	
	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

Înregistrați numele unic al lotului și datele probei, inclusiv ID-ul probei, ID-ul asociat al godeului plăcii de indexare (consultați [Anexa A la pagina 79](#)), placa de bibliotecă, ID-ul godeului plăcii de bibliotecă și ID-ul eprubetei de bibliotecă (dacă este cunoscut). Aceste informații sunt introduse în timpul creării rulării.

Pentru instrucțiuni privind modul de utilizare a aplicației pentru crearea unei rulări, consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931). Înregistrați numele rulării de utilizat în timpul încărcării consumabilelor.

⚠ ATENȚIE

Asigurați-vă că indexurile și probele asociate utilizate în timpul pregătirii bibliotecii corespund celor înregistrate și utilizate pentru Create Run (Crearea rulării). Discrepanțele pot cauza raportarea unor rezultate incorecte sau a unor rezultate absente.

Pregătirea pentru protocol

Pregătirea reactivilor și a echipamentului

Dacă intenționați să secvențiați în aceeași zi, decongelați în prealabil consumabilele de secvențiere. Consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105) pentru instrucțiuni detaliate.

1. Preîncălziți un incubator de microspecimene cu o inserție tip placă MIDI la 47 °C.
2. Scoateți următorii reactivi din cutie și dezghețați după cum urmează.

Tabelul 6 Depozitarea între -25 °C și -15 °C

Reactiv	Nume casetă	Instrucțiuni de decongelare
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute. Apoi, păstrați la gheață până când este necesar.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.
Indexuri UD	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.

Tabelul 7 Depozitarea între 15 °C și 30°C

Reactiv	Nume casetă	Instrucțiuni de decongelare
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	A se utiliza la temperatura camerei.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	A se utiliza la temperatura camerei.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	A se utiliza la temperatura camerei.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	A se utiliza la temperatura camerei.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	A se utiliza la temperatura camerei.



ATENȚIE

Acest set de reactivi conține substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile. Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați fișierele SDS la adresa support.illumina.com/sds.html.

Pregătirea probelor de ADN

Pregătiți următoarele consumabile.

- Probe de ADNg cuantificate
 - a. Aduceți la temperatura ambiantă.
 - b. Centrifugați scurt pentru colectarea picăturilor fine.
 - c. Agitați intermitent sau pipetați pentru amestecare și apoi centrifugați scurt.
- RSB — Vortex sau inversare pentru amestecare. A se păstra la temperatura camerei.
 - RSB și TWB2 sunt ambalate în eprubete similare. Citiți cu atenție fiecare etichetă înainte de utilizare.

Procedura

În funcție de aportul de ADN, care variază în funcție de metoda de cuantificare a ADN-ului utilizată, calculați volumele necesare pentru prepararea probelor de ADN diluat. Formulele sunt furnizate mai jos pentru cele trei metode de cuantificare a ADN-ului testate. Pentru mai multe informații, consultați [Recomandări privind introducerea de ADN la pagina 10](#) și [Anexa B la pagina 82](#).

Calcululele presupun un volum minim de pipetare de 2,0 µl și includ un excedent de 10%. Rotunjirea trebuie efectuată în ultimii pași, după finalizarea calcululelor, utilizând numărul necesar de zecimale pentru a asigura pipetarea precisă.

Opțiunea 1: Introducere ADN 280 ng pentru metodele de cuantificare Quant și Qubit cu interval larg

Concentrația minimă a stocului de ADN al probei este de 11,2 ng/µl. Este mai probabil ca probele < 11,2 ng/µl să eșueze la controlul calității bibliotecii după secvențiere. În funcție de concentrația stocului de ADN, utilizați una dintre ecuațiile de mai jos pentru a efectua calcululele.

1. Pentru o concentrație a stocului de ADN între 11,2 și 154,0 ng/µl, calculați volumul stocului de ADN necesar RSB utilizând un volum total de ADN diluat de 27,5 µl (25 µl plus 10% supraîncărcare) drept constantă:

- a. Calculați volumul stocului de ADN:

$$Volumul\ stocului\ de\ ADN\ (ng) = \frac{280\ ng}{Concentrația\ stocului\ de\ ADN\ (ng/\mu l)} \times (27,5\ \mu l + 10\% \text{ supraîncărcare})$$

- b. Calculați volumul stocului de RSB:

$$Volum\ RSB\ (\mu l) = Volum\ total\ de\ ADN\ diluat\ (\mu l) - volum\ stoc\ ADN\ calculat\ (ng) / Concentrația\ stocului\ de\ RSB\ (ng/\mu l)$$

- c. Verificați calcululele: Confirmați volumul stocului de ADN calculat (µl) + volumul calculat de RSB (µl) = 27,5 µl, volumul total de ADN diluat (o constantă, 25 µl plus un surplus de 10%).

2. Alternativ, pentru concentrațiile stocului de ADN > 154,0 ng/μl, calculați volumul total de ADN diluat și RSB necesar utilizând volumul stocului de ADN 2,0 μl și concentrația stocului de ADN diluat țintă 11,2 ng/μl drept constante.

a. Calculați volumul total de ADN diluat:

$$Volum_{total\ de\ ADN\ diluat} = \frac{concentra\ c\ stocului\ de\ ADN \times \text{volum}_{stoc\ de\ ADN}}{concentra\ c\ stocului\ de\ ADN\ diluat\ țint}$$

b. Calculați volumul de RSB:

$$Volum_{RSB} = Volum_{total\ calculat\ de\ ADN\ diluat} - volum_{stoc\ ADN\ calculat}$$

c. Verificați calculele: Confirmați volumul total al stocului de ADN calculat (μl) - volumul calculat de RSB (μl) = 2,0 μl, volumul stocului de ADN (o constantă).

Treceți la Pasul 3 de mai jos.

Opțiunea 2: Introducere ADN 350 ng pentru metoda de cuantificare Accuclear Ultra High Sensitivity

Concentrația minimă a stocului de ADN al probei este de 14,0 ng/μl. Este mai probabil ca probele < 14,0 ng/μl să eșueze la controlul calității bibliotecii după secvențiere. În funcție de concentrația stocului de ADN, utilizați una dintre ecuațiile de mai jos pentru a efectua calculele.

1. Pentru o concentrație a stocului de ADN între 14,0 până la 192,5 ng/μl, calculați volumul stocului de ADN și RSB necesar utilizând un volum total de ADN diluat de 27,5 μl (25 μl plus 10% supraîncărcare) drept constantă:

a. Calculați volumul stocului de ADN:

$$Volum_{stocului\ de\ ADN} = \frac{Volum_{total\ de\ ADN\ diluat} \times concentra\ c\ stocului\ de\ ADN\ diluat\ țint}{concentra\ c\ stocului\ de\ ADN}$$

b. Calculați volumul stocului de RSB:

$$Volum_{RSB} = Volum_{total\ de\ ADN\ diluat} - volum_{stoc\ ADN\ calculat}$$

c. Verificați calculele: Confirmați volumul stocului de ADN calculat (μl) + volumul calculat de RSB (μl) = 27,5 μl, volumul total de ADN diluat (o constantă, 25 μl plus un surplus de 10%).

2. Alternativ, pentru concentrațiile din stocul de ADN > 192,5 ng/μl, calculați volumul total de ADN diluat și RSB necesar utilizând volumul stocului de ADN 2,0 μl drept constantă.

a. Calculați volumul total de ADN diluat:

$$Volum_{total\ de\ ADN\ diluat} = \frac{concentra\ c\ stocului\ de\ ADN \times \text{volum}_{stoc\ de\ ADN}}{concentra\ c\ stocului\ de\ ADN\ diluat\ țint}$$

b. Calculați volumul de RSB:

$$Volum_{RSB} = Volum_{total\ de\ ADN\ diluat} - volum_{stoc\ ADN\ calculat}$$

c. Verificați calculele: Confirmați volumul total al stocului de ADN calculat (μl) - volumul calculat de RSB (μl) = 2,0 μl, volumul stocului de ADN (o constantă).

3. Etichetați o nouă eprubetă de microcentrifugă de 0,5 ml pentru fiecare probă diluată.

4. Adăugați volumul de RSB calculat mai sus în eprubeta respectivă pentru fiecare probă diluată.
5. Adăugați volumul de stoc de ADN calculat mai sus în eprubeta respectivă pentru fiecare probă diluată.
6. Agitați intermitent, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.

Pregătirea bibliotecii

Utilizați pașii de pregătire din această secțiune pentru a pregăti reactivii în avans.

Dacă nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.

Pregătirea

Pregătiți următoarele consumabile:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) - Agitați pentru a amesteca. Dacă utilizați mai multe eprubete, agitați pentru a amesteca și apoi combinați.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Agitați pentru a amesteca.
 - b. Centrifugați scurt.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Verificați dacă prezintă precipitare. Dacă se observă precipitate, încălziți la 37 °C timp de 10 minute, apoi amestecați până la dizolvarea precipitatelor.
 - b. Agitați temeinic, apoi centrifugați pentru scurt timp.
- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Răsturnați pentru a amesteca. Nu agitați.
 - b. A se păstra la gheață până la utilizare.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Agitați, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.
 - b. A se păstra la temperatura camerei.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Agitați, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.
 - b. A se păstra la temperatura camerei.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Agitați timp de 1 minut.
 - b. Răsturnați de 2-5 ori, apoi agitați bine pentru a suspenda din nou.
- Adaptoare index (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Agitați, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.
 - b. A se păstra la temperatura camerei.

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - Etichetați capacul eprubetei TWB2.
 - Răsturnați bine pentru a amesteca.
- Într-o eprubetă de microcentrifugă etichetată 0,2N NaOH, combinați următoarele volume pentru a prepara 0,2N NaOH în funcție de dimensiunea planificată a lotului. Agitați pentru a amesteca.

NOTĂ Dacă plănuți să cumulați și să denaturați biblioteci în aceeași zi, pregătiți 0,2N NaOH suplimentar. Consultați [Pregătirea la pagina 29](#).

Reactiv	6 probe (μl)	12 probe (μl)	16 probe (μl)	18 probe (μl)	22 de probe (μl)	24 de probe (μl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1080

- Într-o eprubetă conică de 15 ml, combinați următoarele volume pentru a prepara EtOH 80% în conformitate cu dimensiunea planificată a lotului. Suprapunerea pentru utilizarea canalului este inclusă. Agitați pentru a amesteca.

Reactiv	6 probe (ml)	12 probe (ml)	16 probe (ml)	18 probe (ml)	22 de probe (ml)	24 de probe (ml)
100% etanol, pur (tărie normală 200)	4	8	8	12	12	12
Apă fără nuclează	1	2	2	3	3	3



ATENȚIE

Acest set de reactivi conține substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile. Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați fișierele SDS la adresa support.illumina.com/sds.html.

ADN genomic de etichetare

Acest pas utilizează Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) pentru a eticheta ADN-ul, care este un proces care fragmentează și etichetează ADN-ul cu secvențele adaptorului.

Consumabile

- Placă MIDI cu 96 de godeuri
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

Procedura

1. Confirmați că incubatorul cu microprobe cu o inserție tip placă MIDI este preîncălzit la 47 °C.
2. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP1 (Library Plate 1).
3. Desemnați și înregistrați ID-urile godeurilor pentru probe pentru etichetarea probelor de ADN diluate și a reactivilor.
4. Transferați 25 µl de ADN de probă diluat în fiecare godeu.
5. Adăugați 10 µl de TB1 în fiecare godeu.
6. Agitați BLT-PF puternic timp de 1 minut pentru a resuspenda. Nu centrifugați. Repetați după cum este necesar.
7. Adăugați 15 µl de BLT-PF în fiecare godeu.
8. Sigilați și agitați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut.
9. Incubați LP1 timp de 8 minute în incubator de microspecimene preîncălzit, la 47 °C.

NOTĂ Se preconizează condensarea ușoară pe garnitura plăcii. Nu centrifugați.

10. Scoateți sigiliul și adăugați 10 µl de ST2 în fiecare godeu.
11. Sigilați și scuturați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut, apoi treceți la pasul următor.

Curățarea post-etichetare

Următorii pași elimină ADN-ul nelegat și efectuează schimbul de soluție tampon pentru pregătirea pasului următor.

Consumabile

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Canal

Despre reactivi

- Pipetați TWB2 încet pentru a minimiza formarea spumei.
- RSB și TWB2 sunt ambalate în eprubete similare. Citiți cu atenție fiecare etichetă înainte de utilizare.

Procedura

1. Îndepărtați sigiliul și așezați LP1 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (2 minute).
2. Pregătiți TWB2 recipientul cu volume în conformitate cu următorul tabel și etichetați vizibil canalul TWB2. Volumele includ un surplus de 1 ml pentru volumul rezidual din canal. Păstrați canalul pentru pașii ulteriori.

Reactiv	6 probe (μl)	12 probe (μl)	16 probe (μl)	18 probe (μl)	22 de probe (μl)	24 de probe (μl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10900	11800

3. Cu LP1 pe suportul magnetic, folosiți un set de pipete multicanal configurate la 60 μl pentru a îndepărta și elimina supernatantul din fiecare godeu fără a perturba peleta cu bile.
4. Utilizând o pipetă multicanal, adăugați 150 μl TWB2 în fiecare godeu.
5. Sigilați și agitați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut.
6. Îndepărtați sigiliul și așezați LP1 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (2 minute).
7. Readuceți BLT-PF la păstrarea în stare congelată în timpul incubării, apoi treceți la pasul următor.

Indici de ligat

În această secțiune, utilizatorii ligaturază adaptoarele unice cu index dublu pentru fiecare probă, conform indexării planificate în timpul [Planificarea lotului și crearea rulării la pagina 15](#).

Consumabile

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Adaptoare index (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) canal
- 0,2N NaOH (Diluat HP3)

Despre reactivi

- Godeurile plăcii de indexare nu pot fi reutilizate.
- Aspirați și distribuiți ELM încet luând în considerare vâscozitatea soluției.
- RSB și TWB2 sunt ambalate în eprubete similare. Citiți cu atenție fiecare etichetă înainte de utilizare.

Procedura

1. Țineți LP1 pe suportul magnetic și efectuați următorii pași:
 - a. Folosiți o pipetă multicanal configurată la 150 μl pentru a scoate și a elimina supernatantul din fiecare godeu.
 - b. Folosiți o pipetă de 20 μl, pentru a scoate și a elimina TWB2 rezidual din fiecare godeu, fără a perturba peleta cu bile.
 - c. Adăugați 45 μl de ELM în fiecare godeu.

- d. Perforați folia de etanșare de pe placa adaptorului index pentru fiecare dintre godeurile index planificate, utilizând o pipetă P200 multicanal și vârfuri de pipetă noi. Pentru a evita contaminarea, utilizați un nou vârf de pipetă pentru fiecare godeu.
 - e. Adăugați adaptoare index de 5 μ l în godeurile corespunzătoare pentru probe ale LP1, conform indicilor selectați în timpul planificării lotului, utilizând o pipetă multicanal P-10 sau P-20.
2. Sigilați și agitați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut.
 3. Incubați LP1 timp de 8 minute în incubator de microspecimene preîncălzit, la 47 °C.

NOTĂ Se preconizează condensarea ușoară pe garnitura plăcii. Nu centrifugați.

4. Returnați ELM la congelator în timpul incubăției.
5. Îndepărtați sigiliul și așezați LP1 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (2 minute).
6. Cu LP1 pe suportul magnetic, folosiți un set de pipete multicanal configurate la 50 μ l pentru a îndepărta și elimina supernatantul din fiecare godeu fără a perturba peleta cu bile.
7. Spălați bilele după cum urmează.
 - a. Adăugați 150 μ l TWB2 peste bilele din fiecare godeu folosind o pipetă multicanal.
 - b. Sigilați și agitați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut.
 - c. Îndepărtați sigiliul și așezați LP1 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (2 minute).
 - d. Cu LP1 pe suportul magnetic, folosiți un set de pipete multicanal configurate la 150 μ l pentru a îndepărta și elimina supernatantul din fiecare godeu fără a perturba peleta cu bile.
8. Spălați bilele a **doua** oară.
9. Cu LP1 pe suportul magnetic, folosiți un set de pipete configurate la 20 μ l pentru a îndepărta și elimina TWB2 rezidual din fiecare godeu fără a perturba peleta cu bile.
10. Adăugați 45 μ l de soluție preparată anterior 0,2N NaOH în fiecare godeu.
11. Sigilați și scuturați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut, apoi treceți la secțiunea următoare.

Selectare dimensiune și curățare biblioteci

Acest pas utilizează o selecție cu două etape a bibliotecilor. În primul pas, Cleanup Beads sunt adăugate la bibliotecile de eluție și la bilele BLT-PF. Apoi, supernatantul care conține biblioteca de eluție mono-catenară este transferat pe o placă nouă, în timp ce fragmentele care sunt prea mari rămân în urmă. În al doilea pas, Cleanup Beads sunt adăugate la bibliotecile transferate, iar fragmentele care sunt prea mici sunt eliminate. Apoi, bibliotecile sunt eluate și transferate pe placa finală a bibliotecii (FLP).

Consumabile

- Placă MIDI cu 96 de godeuri
- Canale (3)

- Placă PCR
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanol 80% proaspăt preparat (EtOH 80%)

Pregătirea

1. Agitați CB și apoi răsturnați până la repunerea completă în suspensie.
2. Pregătiți canalul cu CB cu volume în conformitate cu următorul tabel și etichetați canalul CB. Volumele sunt suficiente pentru ambii pași de adăugare și includ un excedent de 1 ml în canal pentru volumul rezidual din canal. Nu este necesar să amestecați între pașii de CB adăugare. Bilele vor rămâne dispersate pe durata procedurii.

Reactiv	6 probe (μl)	12 probe (μl)	16 probe (μl)	18 probe (μl)	22 de probe (μl)	24 de probe (μl)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

Procedura

1. Scoateți garnitura și adăugați 40 μl CB în godeurile plăcii LP1 MIDI care conține BLT-PF și 0,2N NaOH.
2. Sigilați și agitați LP1 la 1800 rpm timp de 1 minut.
3. Incubați LP1 în afara suportului magnetic la temperatura camerei timp de 2 minute.
4. Îndepărtați sigiliul și așezați LP1 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (5 minute).
5. În timp ce placa se incubează, etichetați o nouă placă MIDI cu 96 de godeuri LP2.
6. *Transferați* 80 μl de supernatant din LP1 în timp ce se află pe suportul magnetic în godeurile corespunzătoare ale LP2 folosind o pipetă cu canale multiple.
7. Adăugați 40 μl de CB în fiecare godeu al plăcii MIDI LP2.
8. Sigilați și agitați LP2 la 1800 rpm timp de 1 minut.
9. Eliminați placa MIDI LP1.
10. Incubați LP2 în afara suportului magnetic la temperatura camerei timp de 2 minute.
11. Îndepărtați sigiliul și așezați LP2 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (5 minute).
12. Cu LP2 pe suportul magnetic, folosiți un set de pipete configurate la 120 μl pentru a îndepărta și elimina supernatantul din fiecare godeu fără a perturba peleta cu bile.
13. Turnați EtOH 80% preparat anterior într-un canal etichetat și spălați bilele cu LP2 pe magnet după cum urmează.
 - a. Adăugați 180 μl 80% EtOH folosind o pipetă multicanal.
 - b. Așteptați 30 de secunde.

- c. Folosiți o pipetă multicanal configurată la 180 µl pentru a scoate și a elimina supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.
14. Spălați bilele a **doua** oară.
15. Cu LP2 pe suportul magnetic, folosiți un set de pipete configurate la 20 µl pentru a îndepărta și elimina EtOH rezidual din fiecare godeu fără a perturba peleta cu bile.
16. Mențineți LP2 pe suportul magnetic timp de 4 minute ca să se usuce la aer.
17. Eliminați EtOH 80% neutilizat și canalul.
18. Pregătiți canalul RSB cu volume în conformitate cu următorul tabel și etichetați canalul CB. Volumele includ un surplus de 1 ml pentru volumul rezidual din canal.

Reactiv	6 probe (µl)	12 probe (µl)	16 probe (µl)	18 probe (µl)	22 de probe (µl)	24 de probe (µl)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

19. Adăugați 65 µl de RSB peste bilele din fiecare godeu.
20. Sigilați și agitați LP2 la 1800 rpm timp de 1 minut.
21. Incubați LP2 la temperatura camerei timp de 2 minute.
22. Îndepărtați sigiliul și așezați LP2 pe suportul magnetic și așteptați până când lichidul este limpede (2 minute).
23. Etichetați o nouă placă PCR FLP (placa finală din bibliotecă) și cu numele lotului utilizat la crearea rulării.
24. *Transferați* 60 µl de supernatant din LP2 în timp ce se află pe suportul magnetic în godeurile corespunzătoare ale FLP, folosind o pipetă cu canale multiple.



ATENȚIE

Supernatantul conține biblioteca finală și va fi utilizat în timpul etapei de regroupare și denaturare. Nu eliminați.

25. Eliminați toate canalele împreună cu reactivii neutilizați în recipiente.
26. Eliminați placa MIDI LP2.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă se oprește, sigilați placa finală a bibliotecii (FLP) cu Microsigiliu B și depozitați între -25 °C și -15 °C timp de până la 14 zile.

Grupare și denaturare a bibliotecilor

În această secțiune, utilizatorii creează fonduri planificate în [Planificarea lotului și crearea rulării la pagina 15](#) (Planificare lor și creare rulare) și diluează și denaturează.

Consumabile

- HP3 (2N NaOH) sau 0,2N NaOH dacă este preparat în aceeași zi—Vortex, apoi centrifugați scurt.

- NB (Neutralization Buffer)—Agitați, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.
- RSB Resuspension Buffer — Agitați sau inversați pentru amestecare.
- Eprubete microcentrifuge (1 pentru prepararea reactivului și 1 pentru fiecare fond de bibliotecă planificat)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 sau PN 20062291) (1 eprubetă pentru fiecare grupare de bibliotecă planificată)

Pregătirea

1. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a prepara 0,2N NaOH. Etichetați eprubeta 0,2N NaOH. Dacă în timpul Pregătirii Bibliotecii s-a efectuat 0,2N NaOH suplimentar și protocolul este efectuat în aceeași zi, omiteți acest pas.

Pentru a preveni micile erori de pipetare, este pregătit un volum suplimentar.

Reactiv	Volum pentru fiecare celulă de flux S2 (μl)	Volum pentru fiecare celulă de flux S4 (μl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Agitați, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.

Procedura

1. Dacă placa FLP a fost depozitată congelată, pregătiți-o după cum urmează. În caz contrar, treceți la pasul 2.
Placă FLP:
 - a. Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.
 - b. Centrifugați 1 minut la 1000 x g.
 - c. Scoateți garnitura de etanșare de pe FLP.
 - d. Pipetați amestecul de 5 până la 10 ori folosind o pipetă multicanal setată la 30 μl.
 - e. Sigilați și centrifugați 1 minut la 1000 x g.

2. Selectați una dintre următoarele opțiuni pentru a grupa, denatura și dilua bibliotecile pentru fiecare set de 6 sau 16 probe planificate pentru secvențiere.

Opțiunea 1 Secvențiați 6 biblioteci pe celula de flux S2.

- a. Pentru fiecare fond de biblioteci, etichetați o nouă eprubetă de microcentrifugă cu numele grupului, de exemplu biblioteci cumulate (PL) 1, 2, 3 etc.
- b. Scoateți sigiliul și transferați 25 μl din fiecare bibliotecă ADN cu coduri de bare dintr-un anumit set de indexuri S2 de pe placa FLP în eprubeta PL pentru fiecare rulare planificată corespunzătoare, în conformitate cu cumulările de secvențiere planificate în timpul [Planificarea lotului și crearea rulării la pagina 15](#). De exemplu, combinați bibliotecile preparate folosind S2 Index Set 1 în eprubeta PL.
- c. Sigilați placa FLP cu folie autoadezivă și redepozitați-o.
- d. Adăugați 37 μl de 0,2N NaOH în fiecare eprubetă PL.

- e. Agitați fiecare eprubetă PL pentru a amesteca. Centrifugați scurt.
- f. Incubați fiecare eprubetă din PL la temperatura camerei timp de 8 minute.
- g. Adăugați 38 µl de NB în fiecare eprubetă PL.
- h. Agitați fiecare eprubetă PL pentru a amesteca. Centrifugați scurt.
- i. Transferați 225 µl de bibliotecă denaturată, diluată într-o eprubetă de bibliotecă NovaSeq 6000Dx curată.



ATENȚIE

Dacă s-a specificat anterior, ID-ul eprubetei NovaSeq 6000Dx din bibliotecă va fi utilizat pentru a identifica și asocia rularea planificată. Asigurați-vă că ID-ul eprubetei din bibliotecă în care este transferat ansamblul este același ID de eprubetă din bibliotecă specificat în Create Run (Creare rulare), în caz contrar poate apărea o asociere incorectă a rezultatelor probei. Dacă ID-ul eprubetei din bibliotecă este specificat în rularea planificată, confirmați că este utilizată eprubeta corectă. Dacă nu a fost specificat anterior, înregistrați ID-ul eprubetei din bibliotecă utilizat și revizuiți rularea planificată; în caz contrar, rularea (rulările) planificată(e) asociată(e) vor trebui selectate manual la încărcarea instrumentului utilizând numele executării.

Opțiunea 2 Secvențiați 16 biblioteci pe celula de flux S4.

- a. Etichetați o nouă eprubetă de microcentrifugă cu numele fondului, de exemplu biblioteci cumulate (PL) 1, 2, 3 etc.
- b. Scoateți sigiliul și transferați 18 µl din fiecare bibliotecă ADN de pe placa FLP în eprubeta PL, în conformitate cu cumulările de secvențiere planificate în timpul [Planificarea lotului și crearea rulării la pagina 15](#). De exemplu, combinați bibliotecile folosind S4 Index Set 1 în eprubeta PL.
- c. Sigilați placa FLP cu folie autoadezivă și redepozitați-o.
- d. Adăugați 22 µl de RSB în fiecare eprubetă PL.
- e. Adăugați 77 µl de 0,2N NaOH în fiecare eprubetă PL.
- f. Mixați eprubeta PL în agitator vortex. Centrifugați scurt.
- g. Incubați eprubeta din PL la temperatura camerei timp de 8 minute.
- h. Adăugați 78 µl de NB în fiecare eprubetă PL.
- i. Mixați eprubeta PL în agitator vortex. Centrifugați scurt.
- j. Transferați 465 µl de bibliotecă denaturată, diluată într-o eprubetă NovaSeq 6000Dx de bibliotecă curată.

**ATENȚIE**

Dacă s-a specificat anterior, ID-ul eprubetei NovaSeq 6000Dx din bibliotecă va fi utilizat pentru a identifica și asocia rularea planificată. Asigurați-vă că ID-ul eprubetei din bibliotecă în care este transferat ansamblul este același ID de eprubetă din bibliotecă specificat în Create Run (Creare rulare), în caz contrar poate apărea o asociere incorectă a rezultatelor probei. Dacă ID-ul eprubetei din bibliotecă este specificat în rularea planificată, confirmați că este utilizată eprubeta corectă. Dacă nu a fost specificat anterior, înregistrați ID-ul eprubetei din bibliotecă utilizat și revizuiți rularea planificată; în caz contrar, rularea (rulările) planificată(e) asociată(e) vor trebui selectate manual la încărcarea instrumentului utilizând numele executării.

3. Continuați direct cu secvențierea dacă intenționați să începeți rularea în aceeași zi.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă opriți, puneți capacul eprubetei din bibliotecă NovaSeq 6000Dx și depozitați la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 de zile.

Pregătire pentru secvențiere

1. Urmați instrucțiunile de pregătire din Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105) pentru consumabilele din setul planificat pentru secvențiere.
2. Dacă eprubeta din bibliotecă NovaSeq 6000Dx care conține biblioteca cumulată a fost depozitată congelată, pregătiți-o după cum urmează. Dacă treceți direct de la secțiunea anterioară, treceți la punctul 3.
 - a. Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.
 - b. Scoateți capacul și pipetați ușor amestecul de cinci ori folosind o pipetă P1000 setată la 300 μl pentru fondul de biblioteci de celule de flux S4 sau o pipetă P200 setată la 145 μl pentru fondul de biblioteci de celule de flux S2.
 - c. Puneți capacul eprubetei din bibliotecă NovaSeq 6000Dx și scuturați manual toate picăturile de pe fundul acestuia. Nu agitați și nu centrifugați.
3. Încărcați consumabilele. Consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105) pentru detalii.

Interpretarea rezultatelor

TruSight Whole Genome este conceput pentru a secvenția întregul genom uman. Variantele sunt raportate pentru probele care trec de controalele de calitate analitice (CC) pentru utilizare cu aplicații de analiză germinală terțiară din aval.

- Un rezultat de secvențiere, FASTQ sau calitate a probei este considerat valid numai dacă standardul de măsurare a calității îndeplinește sau depășește specificația definită. Dacă standardul de măsurare a calității

este sub specificația definită, performanța va fi raportată ca EȘEC și proba trebuie repetată. Pentru informații despre specificațiile metrice de calitate utilizate pentru a determina validitatea probei, consultați [Controlale de calitate la pagina 32](#).

- Se preconizează că probele care trec de toate pragurile de calitate vor furniza performanța de definire a variantelor descrisă în studiul de acuratețe (consultați [Acuratețe la pagina 41](#)).
- Variantele mici sunt adnotate cu încredere ridicată, intermediară sau scăzută pe baza performanței așteptate a fiecărui tip de variantă (consultați [Determinarea nivelului de încredere a variantelor mici la pagina 37](#)).
- Interpretarea tuturor variantelor de informații trebuie validată de către laborator utilizând fișierele de ieșire a analizei furnizate. Consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931) pentru o descriere a informațiilor furnizate în fișierele de ieșire.

Controlale de calitate

Analiza de secvențiere și validitatea probei sunt determinate automat utilizând controale analitice și sunt raportate de TruSight Whole Genome Analysis Application (consultați [Tabelul 8](#) pentru detalii suplimentare despre specificațiile metrice pentru controlul calității). TruSight Whole Genome nu necesită utilizarea controalelor pozitive externe.

- Rezultatele CC sunt raportate într-un raport consolidat, pentru toate probele dintr-o rulare și în rapoarte CC individuale ale probelor. Rapoartele sunt trimise de software în folderul de analiză. Consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931) pentru locația folderului analizei și a folderului de executare.
- Eșecul specificării controlului calității executării secvențierii anulează executarea secvențierii și oprește analiza suplimentară.
- Eșecul oricărei specificații FASTQ sau a bibliotecii probei invalidează biblioteca de probe și împiedică producerea fișierelor CRAM sau VCF asociate.
- Este posibil să se aplice acțiuni de control al calității conforme cu reglementările sau cerințele de acreditare locale, regionale și/sau naționale.

Pentru informații suplimentare despre repetarea rulărilor de secvențiere sau pentru prepararea bibliotecilor, consultați [Depanare la pagina 65](#).

Tabelul 8 TruSight Whole Genome Descrieri ale specificațiilor metrice de control al calității

	Metrică	Specificații	Descriere
Controlul calității rulării secvențierii	Total % \geq Q30	\geq 85	Măsurarea calității bazei la nivelul rulării. Specificația minimă este setată deoarece rulările %Q30 prea scăzute nu vor trece de bazele Q30 din Controlul calității bibliotecii de probe.

	Metrică	Specificații	Descriere
Controlul calității FASTQ	Randament per probă (bps)	≥ 90.000.000.000	Valoarea minimă este setată să fie echivalentă cu ~26 de ori acoperirea autozomală medie cu cea a probelor de triaj care nu trec de controlul calității bibliotecii pentru a reduce timpul de analiză.
Controlul calității bibliotecă de probe	Acoperire autozomală medie	≥ 35	Acoperire medie printre autozomi. Specificațiile minime sunt stabilite pentru a asigura performanța analitică.
	Procentajul autozomilor cu acoperire mai mare de 20X	≥ 93,94	Măsurarea uniformității acoperirii care detectează probleme nu este legată neapărat de eroarea sistematică GC. Specificațiile minime sunt stabilite pentru a asigura performanța analitică.
	Acoperire normalizată la compartimente GC de la 60% la 79%	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Măsura uniformității acoperirii care detectează eroarea sistematică GC, în special o pierdere a acoperirii în zonele genomului cu %GC mai mare și compoziție de bază mai mică %AT. Specificațiile minime și maxime sunt stabilite pentru a asigura performanța analitică.
	Acoperire normalizată la compartimente GC de la 20 % la 39%	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Măsura uniformității acoperirii care detectează eroarea sistematică GC, în special o pierdere a acoperirii în zonele genomului cu %GC mai mică și compoziție de bază mai mare %AT. Specificațiile minime și maxime sunt stabilite pentru a asigura performanța analitică.
	Acoperire mitocondrială medie	≥ 500	Acoperirea cromozomului mitocondrial. Specificația minimă este setată pentru a asigura limita de detecție SNV mitocondrial.
	Procentul bazelor Q30	≥ 85	Măsurarea calității bazei. Specificațiile minime sunt stabilite pentru a asigura performanța analitică.
	Contaminare estimată a probei	≤ 0,005	Detectează citirile contaminante din alte probe. Specificația maximă este setată pentru a asigura limita de detecție SNV mitocondrială (tipul de variantă cu cea mai mare sensibilitate la contaminare).

Caracteristici de performanță

Următoarele studii de validare au fost efectuate utilizând fluxul de lucru TruSight Whole Genome descris în [Instrucțiuni de utilizare la pagina 15](#) și au fost concepute pentru a asigura robustețea testului față de sursele comune de variație și pentru a oferi recomandări pentru o performanță consecventă. Aceste studii au utilizat

specificațiile standardului de măsurare a calității analitice prezentate în [Tabelul 8](#) ca punct de referință pentru efectuarea cu succes a analizei și ca o condiție prealabilă pentru stabilirea performanței de definire a variantei analitice.

Contaminarea încrucișată

Studiul de contaminare încrucișată a evaluat detectarea incorectă a citirii indicelui din cauza contaminării de la godeu la godeu în timpul pregătirii bibliotecii de probe și a contaminării de la rulare la rulare între cicluri consecutive de secvențiere. 24 de probe de sânge au fost utilizate pentru a evalua contaminarea încrucișată. În total au fost pregătite 24 de biblioteci fiecare de doi operatori utilizând seturile de indexuri de configurare S2 1–4, și bibliotecile grupate au fost secvențiate în ordinea indicelui setat pe NovaSeq 6000Dx Instrument. 16 biblioteci au fost pregătite fiecare de doi operatori utilizând seturile de indexuri de configurare S4 1 și 2 în două replicare și bibliotecile grupate cu seturi de indici alternativi au fost secvențiate pe același NovaSeq 6000Dx.

Pentru a evalua contaminarea încrucișată, citirile de index corecte au fost comparate cu citirile de index de la godeurile adiacente pentru contaminare de la godeu la godeu și executarea de secvențiere anterioară pentru contaminare de la rulare la rulare. Cantitatea de contaminare de la rulare la rulare a fost $\leq 0,003178\%$ pentru rularea S2 și $\leq 0,002487\%$ pentru rularea S4. Pentru a evalua contaminarea de la o probă la alta, a fost utilizată valoarea CC a bibliotecii de probe pentru contaminarea estimată a probei. Cantitatea de contaminare probă la probă a fost de 0,001, cea mai mică valoare raportată de software-ul de analiză. Aceste rezultate indică un risc scăzut de contaminare în cadrul fluxurilor de lucru de pregătire și secvențiere a bibliotecii.

Stabilitate în uz și intermediară

Reactivii de pregătire a bibliotecii au fost evaluați din punct de vedere al stabilității în timpul utilizării trusei, inclusiv mai multe evenimente de congelare-dezghețare și stabilitatea eprubetei deschise.

Pentru testarea ciclului de congelare-dezghețare, componentele congelate au fost supuse unui număr de cinci evenimente de congelare-dezghețare pentru a susține un eveniment de dezambalare și patru evenimente de utilizare a trusei. Pentru stabilitatea în timpul utilizării, volumul necesar pentru a pregăti șase biblioteci de probe a fost îndepărtat la fiecare dintre cele trei cicluri congelare-dezghețare pentru a simula epuizarea volumului în timpul utilizării, iar componentele au fost depozitate timp de încă 31 de zile înainte de testare. La testarea cu ADNg extras de la șase donatori de sânge, toate datele au trecut de indicatorii de control analitic ai analizei. Aceste rezultate indică faptul că reactivii înghețați de pregătire a bibliotecii pot fi utilizați cu până la patru cicluri congelare-dezghețare și stabilitate în timpul utilizării de 30 de zile.

Stabilitatea intermediară a fost evaluată pentru bibliotecile individuale și bibliotecile grupate și denaturate. Toate datele au trecut de parametrii de control analitic ai analizei, indicând o stabilitate de până la 14 zile pentru bibliotecile individuale și o stabilitate de până la 30 de zile pentru bibliotecile grupate și denaturate atunci când sunt depozitate congelate ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ până la $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$), conform descrierii din punctele de oprire sigure.

Recoltarea și depozitarea probelor de sânge

Compatibilitatea eprubetelor de recoltare a sângelui și depozitarea probelor au fost examinate utilizând patru donatori și au fost recoltate probe de sânge în eprubete de recoltare EDTA de la trei furnizori diferiți. ADN-ul genomic (ADNg) a fost extras din fiecare la sosire, pentru momentul zero timp și apoi din nou după ce sângele a fost păstrat timp de 16, 33 și 43 de zile de depozitare la 2 °C până la 8 °C. ADNg extras a fost depozitat congelat (-25 °C până la -15 °C) în soluția tampon de eluție (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) și apoi cuantificat și utilizat pentru prepararea și secvențierea bibliotecii. Toate datele au trecut de parametrii de control analitic ai analizei, indicând compatibilitatea analizei cu trei eprubete EDTA de recoltare a sângelui și sângele stocat până la cinci săptămâni la 2 °C până la 8 °C.

Evaluarea metodei de extracție a ADN-ului

Trei truse de extracție disponibile în comerț au fost evaluate pentru performanța analizei. Două truse au utilizat bile magnetice, una cu și una fără fază solidă și legare pe bază de celuloză, iar o trusă a utilizat o metodă de purificare a acidului nucleic pe bază de membrană de siliciu, folosind coloane de rotație ([Tabelul 9](#)).

Evaluarea a fost efectuată de doi operatori cu un lot de reactivi de extracție per metodă și sânge integral colectat în eprubete EDTA de la patru donatori sănătoși putativ. Fiecare probă de sânge a fost extrasă de patru ori separat, conform instrucțiunilor producătorului, în zile neconsecutive, pentru 16 observații în total per trusă. ADNg extras a fost utilizat pentru a pregăti biblioteci pentru secvențiere și analiză.

Toate observațiile (16/16) pentru fiecare metodă de extracție au trecut de parametrii de control analitic ai analizei. Performanța analizei nu a fost afectată de alegerea metodei de extracție a probei ADNg. Studiile de acuratețe și reproductibilitate analitică au utilizat ADNg extras cu Trusa 3 (izolare coloană filtru de siliciu cu coloane de rotație).

Tabelul 9 Metode de extracție testate pentru performanța TruSight Whole Genome

Set	Metodă de extracție
1	Extracția magnetică a bilelor cu imobilizare reversibilă în fază solidă (SPRI)
2	Extracția magnetică a bilelor cu fază solidă mobilă și legare pe bază de celuloză
3	Izolarea coloană filtru de siliciu cu coloane de rotație

Sensibilitate introducere ADN

Cantitatea de intrare ADNg recomandată pentru testare per probă este de 280 ng sau 350 ng, în funcție de metodele de cuantificare a ADN-ului enumerate în [Recomandări privind introducerea de ADN la pagina 10](#).

Pentru a determina performanța într-un interval de concentrații de introducere de ADNg, cantitatea de ADN utilizată în analiză a fost testată la niveluri de aproximativ ±28,6% din intrarea recomandată. Rezultatele au demonstrat că -25% din introducerea de ADNg recomandat este o limită inferioară pentru analiză. Testul funcționează corespunzător cu o intrare ADNg de până la +28,6% din introducerea recomandată.

Caracterizarea a trei metode distincte de cuantificare a demonstrat că metodele diferite au niveluri diferite de variabilitate și pot produce rezultate nesimilare. Dacă se utilizează o altă metodă decât cele enumerate în [Recomandări privind introducerea de ADN la pagina 10](#), este posibil să fie necesară optimizarea introducerii de ADN țintă. Se recomandă ca ADN pentru probele destinate pentru un anumit lot de pregătire a bibliotecii și executarea secvențierii să fie cuantificate împreună pentru a elimina variabilitatea de la lot la lot, atunci când este posibil, sau să se utilizeze controale de proces pentru a asigura o variabilitate de cuantificare a ADN-ului de ≤ 25% de la lot la lot.

Substanțe care interferează

Acest studiu a evaluat performanța cu substanțe endogene și exogene asociate cu sânge uman și eprubete de recoltare a sângelui. Au fost selectate pentru evaluare bilirubina, hemoglobina și trigliceridele pentru a simula probele icterice, hemolizate și, respectiv, lipemice. Biotina și EDTA au fost selectate pentru evaluare din cauza prezenței în sânge și în eprubetele de recoltare a sângelui (BCT, blood collection tubes) și a impactului potențial asupra chimiei analizei. Substanțele au fost introduse în probele de sânge de la donator înainte de extracție, fie direct, fie după dizolvarea în solvent. Concentrația de testare și detaliile privind creșterea pentru fiecare substanță sunt furnizate în tabelul următor.

Tabelul 10 Substanțe interferente testate pentru performanță TruSight Whole Genome

Substanță	Concentrație de testare	Solvent utilizat în soluția pentru creștere	% creștere adăugat la sânge
Bilirubină (neconjugată)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4%
Hemoglobină	1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	Nu este cazul – Dizolvat în sânge	Nu este cazul – Dizolvat în sânge
Trigliceride	1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	Etanol 100%	4%
Biotină	0,00351 mg/ml ²	Apă	4%
EDTA	5,4 mg/ml ³	Apă	3%

¹ Concentrațiile au fost alese pentru a fi cele mai mari concentrații observate conform „Tabelelor suplimentare pentru testarea interferențelor în chimie clinică, CLSI EP37-ED1:2018”.

² Concentrația a fost aleasă pentru a fi de trei ori „cea mai mare concentrație de medicament sub tratament terapeutic”, menționată în „Tabele suplimentare pentru testarea interferențelor în chimie clinică, CLSI EP37-ED1:2018”.

³ Concentrația a fost aleasă pe baza concentrației EDTA care variază în eprubetele de recoltare a sângelui, variind până la 1,8 mg/ml și pentru a simula un eveniment de umplere scurt, o recoltare de sânge de 33% din volumul BCT nominal, ducând la o concentrație EDTA de 3 ori mai mare în sânge, corespunzând la 5,4 mg/ml.

La testare s-a folosit sânge de la patru donatori. Pentru fiecare substanță interferentă, o alicotă de sânge integral de la fiecare donator a fost îmbogățită cu substanță interferentă și apoi împărțită în patru replicate de extracție ADN. Un control a fost procesat în mod similar fără adăugarea de substanțe. Condițiile de testare și control asociate au fost procesate pentru fiecare donator în cadrul aceluiași eveniment de extracție, iar ADN

extras a fost apoi procesat în cadrul unui singur eveniment de pregătire și secvențiere a bibliotecii. Nu a existat niciun impact asupra performanței testului și nicio dovadă de interferență ca răspuns la niciuna dintre substanțele testate.

Echivalența indexării probelor

TruSight Whole Genome oferă patru seturi de indexuri cu 6 profiluri pentru ciclurile S2 sau două seturi de indexuri cu 16 profiluri pentru configurațiile de cicluri de secvențiere S4. S-a demonstrat că analiza oferă o performanță echivalentă atunci când bibliotecile sunt secvențiate în configurațiile de secvențiere NovaSeq 6000Dx S2 sau S4. În plus, s-a demonstrat că ambele configurații de rulare S2 și S4 ating > 95% din bibliotecile de probe cu o acoperire minimă de 35,0x atunci când sunt testate cu seturile de indexuri prescrise. Astfel, diferite seturi de indexuri și regrupări utilizate pentru secvența pe celulele de flux S2 și S4 pot fi utilizate interschimbabil pentru a asigura scalabilitatea pentru a găzdui fluctuațiile debitului probei și pentru a oferi flexibilitate în procesele de laborator.

Performanță analitică

S-au efectuat studii inițiale de caracterizare pentru a determina pragurile nivelurilor de încredere pentru variantele mici, limita de blank/limita de detecție pentru SNV-urile mitocondriale și pragurile de dimensiune pentru detectarea precisă a expansiunilor STR atunci când se utilizează fluxul de lucru TruSight Whole Genome. Probele reprezentând clasele de variante evaluate de TruSight Whole Genome au fost incluse în evaluarea acurateții analitice și repetabilității, inclusiv precizia în laborator și reproductibilitatea externă. Performanța analitică este raportată pentru ciclurile de secvențiere și probele care au trecut de toate controalele de calitate, cu excepția probelor de amestec concepute pentru a evalua SNV-urile mitocondriale la sau aproape de limita de detecție care nu au trecut de standardul de contaminare. Rezultatele pentru fiecare dintre aceste studii sunt descrise în secțiunile de mai jos.

Studii de caracterizare inițială

Determinarea nivelului de încredere a variantelor mici

Pentru acest studiu, a fost instruit un model de regresie logistică pe centre cu variante foarte reproductibile și slab reproductibile din 96 de replicare ale NA12878 pentru a defini pragurile pentru niveluri de încredere ridicate, medii și scăzute.

Bazele de încredere ridicată pentru un anumit tip de variantă sunt cele în care reproductibilitatea în laborator preconizată îndeplinește sau depășește 99% pentru un prag de scor dat, iar procentul de baze non-N care îndeplinesc criteriul respectiv depășește 30%. Dacă un tip de variantă mic nu are un prag de scor care să îndeplinească aceste criterii, acel tip de variantă nu va avea un nivel de încredere ridicat. Bazele de încredere intermediară sunt cele în care reproductibilitatea previzionată în laborator îndeplinește sau depășește 95% pentru un anumit prag al scorului și tip de variantă. Bazele de încredere scăzută sunt cele în care reproductibilitatea previzionată în laborator este sub 95% pentru un anumit prag al scorului și tip de variantă. Definițiile variantelor pentru un anumit tip de variantă cu un nivel de încredere ridicat sau intermediar includ

majoritatea bazelor %non-N (adică, excluzând lacunele) (consultați Tabelul 6) și demonstrează o performanță ridicată atunci când este evaluat în raport cu seturi de adevăr de variante mici și în evaluări extinse ale preciziei în laborator a replicatelor NA12878.

Tip de variantă	Nivel de încredere	% baze non-N
SNV	Ridicat	89,14%
	Intermediar	3,30%
	Jos	7,56%
Deleții scurte (1-5 bp)	Ridicat	90,88%
	Intermediar	2,45%
	Jos	6,67%
Deleții intermediare (6-15 bp)	Intermediar	86,94%
	Jos	13,06%
Deleții lungi (≥ 16bp)	Intermediar	85,42%
	Jos	14,58%
Insertții scurte (1-5 bp)	Ridicat	88,94%
	Intermediar	4,61%
	Jos	6,45%
Insertții intermediare (6-15 bp)	Intermediar	89,37%
	Jos	10,63%
Insertții lungi (≥ 16bp)	Intermediar	48,92%
	Jos	50,63%

Limita SNV mitocondrială a martorului / Determinarea limitei de detecție

S-au efectuat studii privind limita martorului (LoB) și limita de detecție (LoD) pentru SNV-uri mitocondriale. Pentru studiul SNV mitocondrial, LoB a fost evaluată folosind loci cunoscuți ca neavând nicio variantă (adică definire de referință). LoD este definită ca frecvența alelelor variantă ADNmt SNV pentru care rata de detecție a variantei respective este de 95%.

Pentru a determina LoB și LoD pentru detectarea SNVmt heteroplasmice, probele de ADNg caracterizate temeinic de la doi donatori de sânge diferiți au fost amestecate într-un studiu de titrare la cinci niveluri de diluție cu 20 de replicare per nivel de diluție. Nivelurile de diluție au fost concepute pentru a ținti procente de variante SNVmt (1,2 - 6% VAF) pentru a imita diferite niveluri de heteroplasmă mitocondrială. Probele de ADNg mixte au fost procesate și citirile au fost prelevate în jos pentru a obține o acoperire mitocondrială medie de 500x. Un total de 42 de locuri „heteroplasmice” concepute au fost utilizate în evaluarea din aval. S-a utilizat o analiză a regresiei pentru a estima rapoartele de amestec necesare la 1x LoD țintă și 2x LoD pentru un subset de SNVmt.

Pozițiile în care ADNg din ambele probe de sânge au genotipuri de alele de referință au fost evaluate pentru definiri SNVmt care au trecut de filtru cu o alelă fără referință. Rata fals pozitivă a fost calculată ca 0,8%, în concordanță cu o presupunere zero-LoB conform „Evaluării capacității de detecție pentru procedurile de măsurare clinică în laborator, CLSI EP17-A2-ED1:2012”. Fiecare dintre cele 42 de poziții a fost analizată independent utilizând regresia probit. Valoarea LoD a fost definită ca valoarea VAF preconizată corespunzând ratei de detecție de 95% (C95). Valoarea LoD generală raportată, definită ca percentila 95 a valorilor LoD de pe site-urile de adevăr, a fost de 4,75% VAF. Media distribuției diferențelor absolute între VAF observat și preconizat pentru toate observațiile a fost calculată a fi 0,83%, cu o limită de încredere superioară de 95% de 0,86% VAF.

Determinarea pragului de extindere STR

Din cauza limitărilor tehnice ale STR care depășesc lungimea de citire prin secvențiere (~135 bp), lungimea STR observată cu TruSight Whole Genome va fi adesea o subestimare a lungimii reale. Odată ce lungimea reală STR depășește lungimea mediană a fragmentului (~330 bp), estimarea lungimii STR atinge un platou. Din acest motiv, TruSight Whole Genome evaluează un set țintă de loci pentru care testul poate discrimina cu precizie STR cu lungimi observate în cadrul variației normale față de cele cu lungimi mai mari decât cele observate la o populație sănătoasă putativ („extinsă”) (consultați [Tabelul 2](#) pentru lista de loci evaluați de TruSight Whole Genome).

Pentru a asigura un acord procentual negativ (NPA) agregat de 95% pentru toate centrele STR evaluate de TruSight Whole Genome, pragurile per locație pentru definirea unui STR extins la centrul respectiv au fost setate pentru a obține un NPA mediu de 99,94% per centru. Pentru a ține cont de variabilitatea inerentă a estimărilor dimensiunii STR în cadrul unei populații sănătoase din punct de vedere putativ, pragurile au fost stabilite pe baza distribuției lungimilor STR observate independent în setul de date al Proiectului 1000 de genomi sănătoși din punct de vedere putativ (2.504 probe de la diferite populații procesate cu DRAGEN 3.7.5 și ExpansionHunter 4.0.2).⁴

Pentru a confirma pragurile stabilite utilizând setul de date 1000 Genomes Project, ADNg extras din 16 probe de referință de pe linia celulară (Materiale de referință pentru testarea genetică a Programului de la Centrul pentru controlul Bolilor (Get-RM)) cu o varietate de dimensiuni de STR estimate independent au fost prelucrate cu TruSight Whole Genome. 10 replicare de bibliotecă pentru fiecare dintre cele 16 probe au fost pregătite și testate de șase operatori pentru un total de 960 de observații, iar dimensiunile de STR au fost estimate independent pentru fiecare replicat. Rata de rezultate fals pozitive la nivelul probei observate în toți locii vizați a fost de 0,35%.

Limita de detecție (LoD) a fost estimată pentru cei 28 de loci STR vizați cu liniile celulare testate pe baza dimensiunilor alelelor observate cu TruSight Whole Genome și a dimensiunilor alelelor așteptate pe baza caracterizării independente anterioare ([Tabelul 11](#)). Pentru locii selectați, a fost determinată o limită de detecție pentru mai mult de un STR în același loc, pentru un total de 35 STR. LoD este dimensiunea estimată la care expansiunea STR preconizată este detectată pentru 95% dintre alele pe baza unui model probit cu praguri confirmate pentru distingerea dimensiunilor normale și extinse ale STR. Datele din toate centrele cu dimensiuni cunoscute de alele au fost grupate împreună pentru a obține estimări LoD pentru fiecare centru pe baza pragului specific al centrului pentru un STR extins. Lungimea repetiției FMR1 a fost subestimată sistematic în comparație cu alte STR și a necesitat un model personalizat pentru a estima corespunzător LoD.

Pragurile confirmate specifice centrului pentru STR expandate, LoD estimată și observată pentru centrele vizate și pragul bolii pe baza literaturii de specialitate disponibile (numai în scopuri ilustrative) pentru centrele STR vizate sunt furnizate în [Tabelul 11](#). Pentru expansiunile STR mai lungi decât pragul dictat de lungimea citirii și pentru care lungimea preconizată nu poate fi observată direct, o lungime observată aproximează o lungime medie care ar fi observată pe parcursul mai multor cicluri de secvențiere. Pentru expansiunile STR mai scurte decât pragul dictat de lungimea de citire, lungimile așteptate și observate sunt aceleași.

Tabelul 11 Rezumat al capacității estimate de detectare pentru centrele TruSight Whole Genome STR vizate

Locus țintă ^a	Prag STR extins (bp) pe baza setului de date din Proiectul 1000 de genomi	LoD estimată (lungime preconizată, bp)	LoD estimată (lungime observată, bp)	Pragul bolii (lungime reală, bp) ^b
AFF2	168	266	221	600 ⁵
AR	114	115	115	114 ⁶
ATN1	90	92	92	135 ^{7,8}
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	Nu se aplică
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	Nu se aplică
C9ORF72 ^c	200	298	233	360 ^{9,10}
CACNA1A	57	57	57	60 ^{7,8}
CBL	171	281	227	243 ⁵
CNBP	192	308	237	300 ^{5,11}
CNBP_CA	102	102	102	Nu se aplică
CNBP_CAGA	68	80	80	Nu se aplică
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	Nu se aplică
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}

Locus țintă ^a	Prag STR extins (bp) pe baza setului de date din Proiectul 1000 de genomi	LoD estimată (lungime preconizată, bp)	LoD estimată (lungime observată, bp)	Pragul bolii (lungime reală, bp) ^b
FXN_A	200	298	233	Nu se aplică
GLS	111	115	115	270 ¹⁷
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	Nu se aplică
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹
NIPA1	33	33	33	Nu se aplică
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	Nu se aplică
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	Nu se aplică
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Locii cu STR alternativi sunt adnotați de LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (de ex. ATXN7_GCC).

^b Pragurile bolii furnizate în scopuri ilustrative numai pe baza literaturii publicate; N/A (Nu se aplică) în această coloană indică faptul că este posibil ca STR să nu fie asociat cu o expansiune patogenă publicată.

^c 100% din replicatele NA23378 au detectat o expansiune STR în C9ORF72, sugerând o expansiune necaracterizată anterior în acel centru în acea probă. Această probă de linie celulară a fost exclusă din analiză.

^d Extinderile intermediare pot fi, de asemenea, asociate cu un fenotip.

Acest studiu a demonstrat profiluri de precizie și acuratețe similare pentru estimările dimensiunii STR pentru loci țintă diferiți, limita de detecție pentru expansiunile STR fiind în mare parte determinată de pragul selectat (pe baza distribuției dimensiunii în cadrul populației de proiect 1000 Genomes) și nu de diferențele capacității de detecție din cadrul centrelor. Toate valorile LoD estimate pe scala de lungime preconizată au fost mai mari decât lungimile observate la populațiile sănătoase din punct de vedere putativ și mai mici decât multe praguri de boală publicate, făcând pragurile asociate de definire a expansiunii STR utile pentru marcarea repetiției într-un anumit locus ca potențial extins. Pragurile raportate aici au fost utilizate pentru a evalua precizia detectării extinderii STR.

Acuratețe

Acuratețea analitică a fost determinată prin compararea definirilor variantelor TruSight Whole Genome cu rezultatele obținute folosind metode alternative. Metodele de referință au fost alese pe baza unei diferențe considerabile comparativ cu TruSight Whole Genome, care utilizează pregătirea bibliotecii legate de bile Nextera™, chimia de secvențiere a 2 coloranți pe NovaSeq 6000Dx și DRAGEN 3.9.5 pentru definirea variantelor. A fost efectuată o abordare reprezentativă a TruSight Whole Genome pentru validarea probelor

care reprezintă variante din toate clasele de variante incluse în rezultatul analizei. Au fost utilizate în total 459 de probe unice care au trecut prin controlul calității analitice pentru a evalua precizia TruSight Whole Genome. Probele au fost testate pe trei loturi de reactivi și consumabile de pregătire a bibliotecii, patru loturi de truse de secvențiere S4, opt operatori, cinci NovaSeq 6000Dx Instrument și două centre interne. Au fost pregătite și secvențiate 31 de fonduri de bibliotecă independente.

Următorul tabel prezintă definițiile valorilor calculate în diverse studii de acuratețe.

Termen	Definiție
Nivel de încredere scăzut (LCL)	Limită de încredere unilaterală mai mică cu 95% folosind metoda Wilson.
Acord procentual negativ (NPA) ¹	Procentul de centre negative, așa cum este definit de metoda de referință, care sunt identificate în mod consecvent ca fiind negative cu TruSight Whole Genome.
Acord procentual pozitiv (PPA) ²	Procentul de variante definite în metoda de referință care sunt definite în mod consecvent cu TruSight Whole Genome.
Valoare predictivă pozitivă tehnică (TPPV) ³	Procentul de variante definite cu TruSight Whole Genome care sunt definite în mod consecvent în metoda de referință.

¹ Pentru precizia detectării extinderii STR și precizia detectării alelelor SMN1, NPA = Adevărat Negativ / (Adevărat Negativ + Fals Pozitiv).

² Pentru precizia detectării extinderii STR și precizia detectării alelelor SMN1, PPA = Adevărat Pozitiv / (Adevărat Pozitiv + Fals negativ).

³ Pentru precizia detectării extinderii STR și precizia detectării alelelor SMN1, TTPV = Adevărat Pozitiv / (Adevărat Pozitiv + Fals pozitiv).

Precizia variantelor mici

Precizia definirii cu variante mici a fost evaluată utilizând ADN-ul genomic extras din sânge integral periferic de la 195 de donatori sănătoși putativ. Definițiile de variante TruSight Whole Genome au fost comparate cu definițiile cu variante dintr-un test de secvențiere a întregului genom validat clinic, efectuat la Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA Laboratory ca metodă de referință. Fluxul de lucru de secvențiere a întregului genom al metodei de referință utilizează un preparat de bibliotecă TruSeq™ fără PCR bazat pe ligaturare, chimie de secvențiere cu 4 culori pe sistemul de secvențiere HiSeq™ și DRAGEN 3.8.4 pentru definirea variantelor. Inserțiile și delețiile > 31 bp nu au fost caracterizate în acest studiu deoarece nu au fost validate în metoda de referință.

Un rezumat al preciziei pentru toate definițiile variantelor mici este afișat în [Tabelul 12](#) și [Tabelul 13](#).

Tabelul 12 Analiză TruSight Whole Genome Precizia pentru variantele mici stratificate în funcție de nivelul și dimensiunea încrederii (probe de sânge putativ sănătoase)

Subtip de variante	Nivel de încredere	Definiri consecvente prin metoda de referință	Definiri exclusive prin metoda de referință	Definiri consecvente analiză	Definiri exclusive pentru analiză	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-uri	Ridicat	261.728.580	1.573.877	261.603.149	208.639	99,4% (99,4%)	99,9% (99,9%)
	Intermediar	6.677.589	421.718	6.519.811	151.128	94,1% (94,0%)	97,7% (97,7%)
	Jos	6.864.840	3.251.709	6.649.756	2.151.388	67,9% (67,8%)	75,6% (75,5%)
Deleții scurte (1-5 bp)	Ridicat	11.978.745	201.783	12.246.922	67.277	98,3% (98,3%)	99,5% (99,5%)
	Intermediar	2.875.258	45.290	3.050.170	47.593	98,4% (98,4%)	98,5% (98,5%)
	Jos	1.802.544	228.582	1.966.974	221.449	88,7% (88,7%)	89,9% (89,8%)
Deleție medie (6-15 bp)	Intermediar	858.673	20.079	860.493	18.361	97,7% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Jos	145.618	28.300	157.398	41.824	83,7% (83,6%)	79,0% (78,9%)
Deleție lungă (16-31 bp)	Intermediar	344.168	14.334	336.976	31.165	96,0% (95,9%)	91,5% (91,5%)
	Jos	54.444	23.438	53.835	47.272	69,9% (69,6%)	53,2% (53,0%)
Insertie scurtă (1-5 bp)	Ridicat	11.212.366	164.651	11.380.307	49.776	98,6% (98,5%)	99,6% (99,6%)
	Intermediar	1.015.324	41.890	988.512	36.051	96,0% (96,0%)	96,5% (96,5%)
	Jos	639.663	198.700	576.797	180.458	76,3% (76,2%)	76,2% (76,1%)
Insertie medie (6-15 bp)	Intermediar	790.968	18.163	798.572	17.111	97,8% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Jos	76.105	24.188	88.389	35.819	75,9% (75,7%)	71,2% (71,0%)

Subtip de variante	Nivel de încredere	Definiri consecvente prin metoda de referință	Definiri exclusive prin metoda de referință	Definiri consecvente analiză	Definiri exclusive pentru analiză	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Inserție lungă (16-31 bp)	Intermediar	159.927	3.135	159.432	8.639	98,1% (98,0%)	94,9% (94,8%)
	Jos	102.552	22.199	103.892	55.724	82,2% (82,0%)	65,1% (64,9%)

Tabelul 13 Rezumatul TruSight Whole Genome NPA al definițiilor cu variante mici stratificate în funcție de nivelul de încredere

Nivel de încredere	Definiri negative consecvente	Metodă de referință Definiri exclusiv negative	NPA (LCL)
Ridicat	202.276.243.790	127.465.816	99,9% (99,9%)
Intermediar	3.307.740.675	77.650.177	97,7% (97,7%)
Jos	3.653.569.580	439.038.662	89,3% (89,3%)

Un studiu suplimentar privind acuratețea a fost efectuat pentru a evalua detectarea variantelor mici cu probe de ADN de pe linia celulară de referință disponibile în comerț (Coriell Institute for Medical Research) cu seturi de definiții bine caracterizate generate de Genome in a Bottle (GIAB) Consortium. Pentru acest studiu, seturile de definiții GIAB au fost utilizate ca metodă de referință. Adevărul stabilit în aceste probe include inserții și deleții mai mari de 31 bp, astfel încât inserțiile și delețiile mai mari au fost incluse în această evaluare. Aceste mostre au inclus HG001-005 și NA24695 cu rezultatele prezentate în agregat în Tabelul 14.

Tabelul 14 Analiză TruSight Whole Genome Precizia pentru variantele mici stratificate în funcție de nivelul și dimensiunea încrederii (probe de linii celulare bine caracterizate)

Subtip de variante	Nivel de încredere	Definiri consecvente GIAB	Definiri exclusive GIAB	Definiri consecvente analiză	Definiri exclusive pentru analiză	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-uri	Ridicat	21.431.369	2.552	21.439.303	3.954	> 99,9% (> 99,9%)	> 99,9% (> 99,9%)
	Intermediar	908.172	1.259	910.058	2.175	99,9% (99,9%)	99,8% (99,8%)
	Jos	720.717	59.691	722.180	28.721	92,4% (92,3%)	96,2% (96,1%)

Subtip de variante	Nivel de încredere	Definiri consecvente GIAB	Definiri exclusive GIAB	Definiri consecvente analiză	Definiri exclusive pentru analiză	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Deleție scurtă (1-5 bp)	Ridicat	1.080.383	690	1.090.370	730	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Intermediar	423.547	788	437.019	606	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Jos	263.828	2.624	281.217	2.088	99,0% (99,0%)	99,3% (99,2%)
Deleție medie (6-15 bp)	Intermediar	142.671	238	144.997	167	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Jos	86.174	812	91.710	546	99,1% (99,0%)	99,4% (99,4%)
Deleție lungă (≥ 16 bp)	Intermediar	34.414	315	34.580	55	99,1% (99,0%)	99,8% (99,8%)
	Jos	9.985	393	10.212	106	96,2% (95,9%)	99,0% (98,8%)
Insertie scurtă (1-5 bp)	Ridicat	927.288	221	925.787	271	> 99,9% (> 99,9%)	> 99,9% (> 99,9%)
	Intermediar	158.346	294	137.081	250	99,8% (99,8%)	99,8% (99,8%)
	Jos	93.857	2.402	75.687	1.427	97,5% (97,4%)	98,1% (98,1%)
Insertie medie (6-15 bp)	Intermediar	91.117	116	89.054	60	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Jos	37.925	745	36.670	406	98,1% (98,0%)	98,9% (98,8%)
Insertie lungă (≥ 16 bp)	Intermediar	11.081	46	11.110	17	99,6% (99,5%)	99,8% (99,8%)
	Jos	14.086	607	14.312	262	95,9% (95,6%)	98,2% (98,0%)

Precizia variantei numărului copii

Acuratețea definirii CNV a fost evaluată folosind aceeași metodă de referință și probe de la donatori de sânge putativ sănătoși (195) care au fost utilizate pentru a evalua precizia definirii variantelor mici. Fiecare CNV este considerat ca fiind detectat în setul de definiri dacă cel puțin 50% din CNV este acoperit de uniunea definirilor CNV de același tip (CÂȘTIG/PIERDERE) din setul de definiri corespondente. TruSight Whole Genome definește

un set de regiuni genomice care sunt excluse din definirea CNV pe baza unei evaluări a datelor probei de la 1000 Genomes și 77 de donatori de sânge sănătoși putativ, utilizând valori legate de valorile aberante ale adâncimii acoperirii, valorile aberante ale divergenței acoperirii și lacunele de acoperire pentru a stabili regiuni ale genomului care nu sunt raportabile pentru CNV. Definirea CNV a fost evaluată numai în regiunile genomice care erau comune atât pentru metoda de referință, cât și pentru TruSight Whole Genome. Un rezumat al preciziei pentru toate definițiile CNV este afișat în [Tabelul 15](#) și [Tabelul 16](#).

Tabelul 15 Analiză TruSight Whole Genome Precizie pentru CNV-uri stratificate în funcție de dimensiune și tip

Dimensiune	Tip	Definiri consecvente prin metoda de referință	Definiri exclusive prin metoda de referință	Definiri consecvente analiză	Definiri exclusive pentru analiză	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10-25 kbp	CÂȘTIG	443	98	342	56	81,89% (79,01%)	85,93% (82,82%)
	PIERDERE	4,162	457	4,155	679	90,11% (89,36%)	85,95% (85,11%)
25-50 kbp	CÂȘTIG	355	117	370	76	75,21% (71,81%)	82,96% (79,83%)
	PIERDERE	1.587	16	1.622	7	99,00% (98,50%)	99,57% (99,21%)
50-100 kbp	CÂȘTIG	228	0	187	20	>99,99% (98,83%)	90,34% (86,42%)
	PIERDERE	723	5	697	6	99,31% (98,60%)	99,15% (98,36%)
≥100 kbp	CÂȘTIG	371	1	335	5	99,73% (98,80%)	98,53% (97,01%)
	PIERDERE	541	23	569	1	95,92% (94,32%)	99,82% (99,22%)
În general (Toate CNV ≥ 10 kbp)	CÂȘTIG	1.397	216	1.234	157	86,61% (85,15%)	88,71% (87,24%)
	PIERDERE	7.013	501	7.043	693	93,33% (92,84%)	91,04% (90,49%)

Tabelul 16 Rezumatul TruSight Whole Genome NPA al definițiilor CNV

Dimensiune	Tip	Definiri negative consecutive	Definiri exclusiv negative prin metoda de referință	Definiri exclusive pentru analiză	NPA (LCL)
În general (Toate CNV-urile \geq 10 kbp)	CÂȘTIG	548.478.033.220	5.701.311	6.400.382	> 99,99% (> 99,99%)
	PIERDERE	548.591.794.675	11.719.913	8.543.877	> 99,99% (> 99,99%)

Rulări de precizie a homozigității

Valoarea predictivă pozitivă tehnică (TPPV) pentru definițiile ROH a fost evaluată utilizând aceeași metodă de referință și probe de la donatori de sânge putativ sănătoși (195) care au fost utilizate în evaluările de precizie ale variantei mici și CNV. Evenimentele ROH au fost determinate prin identificarea regiunilor din genom care conțin o secvență de definiții SNV homozigote fără SNV-uri heterozigote sau lacune lungi fără variante. Astfel de regiuni de semințe au fost apoi extinse la stânga și la dreapta și evaluate pentru definiții homozigote înconjurătoare sau prezența SNV-urilor heterozigote. Evenimentele ROH detectate de TruSight Whole Genome au fost comparate cu detectările SNV din metoda de referință. Un rezumat al TPPV pentru detectările ROH este prezentat în [Tabelul 17](#).

Tabelul 17 TruSight Whole Genome Precizie pentru evenimentele ROH stratificate în funcție de dimensiune

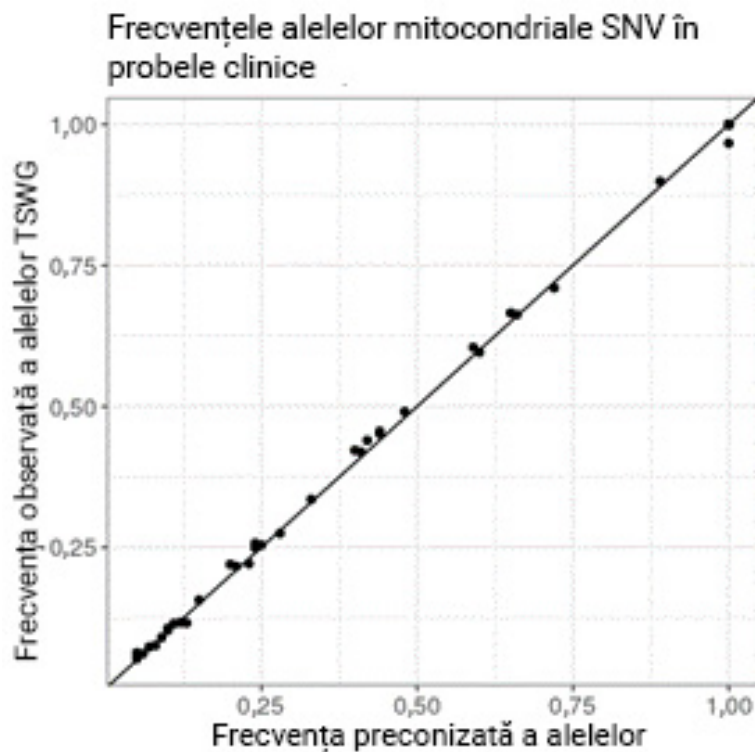
Dimensiune	Medie TPPV	TPPV (LCL)
10-25 kbp	81,44%	80,77%
25-50 kbp	82,14%	81,82%
50-100 kbp	81,77%	81,55%
100-500 kbp	82,19%	81,98%
\geq 10 kbp	82,07%	81,94%
\geq 500 kbp	85,47%	84,66%

Acordul procentual pozitiv (PPA, Positive Percent Agreement) pentru detectarea ROH a fost determinat în probele clinice obținute din surse externe prin compararea definițiilor TruSight Whole Genome către ROH din metode ortogonale, inclusiv microanaliză cromozomială și evaluare bazată pe PCR. Un eveniment ROH a fost considerat detectat dacă cel puțin 50% din regiunea raportată ca ROH prin metoda ortogonală s-a suprapus peste uniunea evenimentelor ROH definită de TruSight Whole Genome. PPA între Analiză TruSight Whole Genome și metodele ortogonale a fost de 34/34 (100%) pentru toate evenimentele ROH preconizate (\geq 4 Mb).

Precizie SNV mitocondrial heteroplasmatic

Acuratețea definirii SNVmt a fost evaluată pe 41 de probe clinice depozitate anterior, provenite de la centre externe. Fiecare probă clinică a conținut o valoare SNVmt raportată anterior la un centru definit și cu un grad definit de heteroplasmie, pe baza analizei cunoscute țintite pentru ADNmt cu heteroplasmie (MITOP). Frecvențele alelelor estimate de TruSight Whole Genome au fost puternic corelate cu frecvențele preconizate, așa cum au fost precise de MITOP. Au fost detectate toate SNV-urile ADNmt preconizate, rezultând un PPA de 100% (41/41).

Figura 3 Frecvențele alelelor mitocondriale SNV observate cu TruSight Whole Genome față de frecvențele alelelor preconizate



Un studiu suplimentar privind precizia SNVmt a fost efectuat folosind aceleași 195 de probe de sânge și aceeași metodă de referință descrisă în studiile privind precizia în variantă mică și CNV. Setul de referință negativ a fost definit ca definiții nevariante sigure (filtru PASS), iar setul de referință pozitiv a fost definit ca definiții SNVmt cu o frecvență a alelelor > 2,5%. Pozițiile cu un filtru non-pass sau cu o definire de variantă non-SNV au fost excluse. Un rezumat al preciziei pentru SNVmt este prezentat în [Tabelul 18](#).

Tabelul 18 TruSight Whole Genome Acuratețea definițiilor ADNmt SNV

Măsură de precizie	Metodă de referință consecventă pozitivă	Metodă de referință exclusiv pozitivă	Analiză exclusiv pozitivă	Metodă de referință consecventă negativă	Metodă de referință exclusiv negativă	Analiză exclusiv negativă	Valoare măsură de precizie (LCL)
PPA	6875	0	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99% (99,96%)
TPPV	6875	Nu se aplică	6	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	99,91% (99,83%)
NPA	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	3171049	24268	20564	99,24% (99,23%)

Precizia detectării extinderii STR

Acuratețea detectării expansiunii STR s-a bazat pe 160 de probe totale preparate prin extracția ADNg de la persoane afectate clinic, cu expansiuni în anumite centre confirmate prin PCR/amorsare repetată (RP)-PCR sau Southern Blot efectuate într-un mediu de laborator CLIA. Pragurile determinate în [Tabelul 11](#) au fost utilizate pentru a defini starea STR a unei alele într-un locus specific ca normal (dimensiunea STR estimată mai mică sau egală cu pragul) sau extinsă (mai mare decât pragul).

PPA a fost calculat utilizând numai probe confirmate clinic, NPA a fost calculat utilizând numai probe individuale de sânge sănătos putativ, iar TPPV a fost calculat pentru ambele grupuri de probe. Pentru alelele în care nu era disponibilă o probă confirmată clinic, PPA nu a putut fi calculat. În plus, pentru alelele în care o probă confirmată clinic nu a fost disponibilă și nu au existat definiții fals pozitive, TPPV nu a putut fi calculat. NPA a fost calculat pentru toate expansiunile STR. Numărul de probe clinice testate pentru o anumită extindere STR și parametrii de precizie sunt furnizați în [Tabelul 19](#).

Tabelul 19 TruSight Whole Genome Parametri de precizie pentru extinderile STR

Extindere STR	Probe clinice testate	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>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	Nu se aplică	Nu se aplică	>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%
ATXN7_GCC	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%

Extindere STR	Probe clinice testate	PPA	TPPV	NPA
ATXN8OS	0	Nu se aplică	0,00%	99,74%
ATXN8OS_CTA	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
C9ORF72	21	>99,99%	>99,99%	>99,99%
CACNA1A	5	>99,99%	83,33%	99,74%
CBL	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
CNBP	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
CNBP_CA	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
CNBP_CAGA	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
CSTB	0	Nu se aplică	0,00%	99,74%
DIP2B	0	Nu se aplică	0,00%	99,74%
DMPK	42	>99,99%	>99,99%	>99,99%
FMR1	47	> 99,9%	>99,99%	>99,99%
FXN	0	Nu se aplică	0,00%	99,74%
FXN_A	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
GLS	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
HTT	10	>99,99%	83,33%	99,49%
HTT_CCG	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
JPH3	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
NIPA1	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
NOP56	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
NOP56_CGCCTG	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
NOTCH2NL	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
PABPN1	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
PHOX2B	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
PPP2R2B	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
TBP	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
TOATE	160	98,12%	92,35%	99,94%

Evaluarea PPA general al detectării expansiunii STR la nivelul tuturor locilor reprezintă o aproximare bună a PPA specific locusului, utilizând probele clinice disponibile. Evaluarea PPA în mod specific pentru locusul FMR1 poate servi drept o legătură inferioară pentru PPA al locilor care nu au fost profilați direct din cauza pragului mare pentru anormalitatea dimensiunii STR.

Precizia detectării alelelor SMN1

Acuratețea detectării absenței alelei C în SMN1 (NM_000344.3:c.840C) a fost evaluată în 26 de probe clinice din cazuri cu diagnostic de atrofie musculară spinală (AMS) și pierdere homozigotă a exonului 7 în SMN1 confirmată prin picătură digitală PCR sau MLPA. Acuratețea identificării prezenței alelei SMN1 c.840C a fost evaluată pe probe de sânge de la indivizi sănătoși din punct de vedere putativ. Fiecărei probe i s-a atribuit un singur standard statistic (Adevărat pozitiv (TP), Fals pozitiv (FP), Fals negativ (FN) sau Adevărat negativ (TN)) pe baza prezenței detectate (statut SMA negativ) sau a absenței (statut SMA pozitiv) ale alelei C în poziția c.840 a genei SMN1 în comparație cu starea preconizată. Estimările PPA, TPPV și NPA au fost efectuate atât în setul de probe pozitive, cât și în setul de probe negative (consultați [Tabelul 20](#)).

Tabelul 20 Indicatori de precizie pentru detectarea absenței alelelor SMN1 c.840C

Măsură de precizie	TP	FP	TN	FN	Valoare măsură de precizie
PPA	26	Nu se aplică	Nu se aplică	0	>99,99%
TPPV	26	0	Nu se aplică	Nu se aplică	>99,99%
NPA	Nu se aplică	0	195	Nu se aplică	>99,99%

Repetabilitate

Precizie intralaborator

Precizia intralaborator a fost evaluată utilizând ADNg extras cu o varietate de variante cunoscute în întregul genom. Acestea au inclus SNVmt aproape și cu mult peste LoD, probe care conțin alela SMN1 c.840C și probe cu expansiuni repetate FMR și HTT1 la lungimi apropiate de și cu mult peste LoD. Probele au fost testate folosind nouă condiții unice, concepute cu trei operatori, trei loturi de reactivi de pregătire a bibliotecii, trei loturi de consumabile de secvențiere și trei instrumente de secvențiere.

Fiecare probă a fost rulată în duplicat în aceeași rulare pentru a evalua variația din cadrul aceleiași rulări și fiecare caz de test a fost testat de două ori pentru două rulări per condiție pentru variația dintre rulări. Fiecare probă a fost evaluată utilizând 36 de observații, iar designul a oferit 18 grade de libertate pentru evaluarea repetabilității. Lista membrilor grupului, tipul de eșantion și variantele evaluate pentru fiecare membru al grupului este prezentată în [Tabelul 21](#). Probele 1-4 și 9-12 au fost derivate atât de la bărbați, cât și de la femei cu descendență caucaziană, africană și asiatică autoidentificată pentru a furniza un set de probe diversificat.

Tabelul 21 Compoziția probei pentru eșantionul utilizat pentru studiul de precizie în laborator

Panou	Nr. probă	Tipul de probă	Variante
A	1	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	2	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	3	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	4	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	5	Amestec artificial de ADNg din sânge	SNV-uri mitocondriale la nivel LoD scăzut
	6	Linie celulară artificială NA20241 ¹	STR extins în loci FMR1 la nivel LoD scăzut
	7	Linie celulară artificială NA20208	STR extins în loci HTT la nivel LoD scăzut
	8	Linie celulară artificială NA23686	Absența SMN1 c.840C
B	9	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	10	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	11	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	12	ADNg din sânge	Variante mici, CNV, ROH, STR neextinse, prezența SMN1 c.840C
	13	Amestec artificial de ADNg din sânge	SNVmt-uri la nivel LoD ridicat
	14	Linie celulară artificială NA07862	STR extins în loci FMR1 la nivel LoD ridicat
	15	Linie celulară artificială NA20253	STR extins în loci HTT la nivel LoD ridicat
	16	Linie celulară artificială NA03814	Absența SMN1 c.840C

Nivel LoD ridicat: Frecvența alelelor variantelor aproximativ la 2,0x – 4,0x LoD.

Nivel scăzut LoD: Frecvența alelelor variantelor aproximativ la 1,0x – 1,5x LoD.

¹ Rezultatele pentru NA20241 nu au fost raportate în cifre finale, deoarece s-a stabilit că acestea sunt semnificativ sub 1,0x LoD și, prin urmare, nu au îndeplinit cerințele privind probele.

În evaluarea calitativă, sunt raportate valori ale reproductibilității care tratează variantele ca entități calitative (varianta este prezentă sau varianta nu este prezentă). Au fost evaluate și raportate diferite valori ale definițiilor pozitive sau negative și diferite valori calitative pentru fiecare tip de variantă (Tabelul 22). La evaluarea reproductibilității definițiilor de tip variantă mică, CNV și ROH, s-au utilizat definiții de variante efectuate într-un replicat de rulare de caracterizare pentru fiecare probă care a servit drept punct de comparație pentru toate celelalte replicare ale probei respective în studiu.

Tabelul 22 Rezumatul evaluării calitative a reproductibilității pentru fiecare tip de variantă

Tip de variantă	Pozitiv	Negativ	Tip de comparație	Parametri calitativi
Variante mici	Filtre de trecere a definițiilor variantelor	Filtre de trecere definiții de referință homozigote	Concordanța cu setul de definiții de la executările inițiale de caracterizare	Acord pozitiv mediu (APA) și Acord negativ mediu (ANA)
CNV-uri	Filtre de trecere definire CNV	Pozițiile genomice care nu se suprapun cu un număr de identificare a variantei de copiere care trece	Concordanța cu setul de definiții de la executările inițiale de caracterizare	APA și ANA
ROH	Variantă ROH	Pozițiile genomice care nu se suprapun pe o variantă de ROH	Concordanța cu setul de definiții de la executările inițiale de caracterizare	APA și ANA
Extindere STR	Probă cu expansiune STR în cel puțin un locus țintă	Probă fără expansiuni în oricare dintre locii vizați	Concordanța cu starea probei, definită prin caracterizarea probei în funcție de analiza ortogonală	Definiri pozitive procentuale (PPC) și definiri negative procentuale (PNC)
Detectare SMN1 c.840C	Probă fără alela C la poziția c.840 a SMN1 (SMA pozitiv)	Probă care conține cel puțin o copie a alelei C în poziția aproximativ 840 a SMN1 (sMA negativ)	Concordanța cu starea probei, definită prin caracterizarea probei în funcție de analiza ortogonală	PPC și PNC
SNVmt	Filtre de trecere pentru definiții SNV mitocondriale	Poziție non-variantă în cromozomul mitocondrial care trece filtre	Concordanța cu definițiile variante și nevariante efectuate în probe nediluate	PPC și PNC

Evaluarea cantitativă a diferitelor tipuri de variante a implicat o evaluare a variabilității fie a indicatorilor cantitativi care stau la baza definițiilor calitative, fie, în cazul variantelor mici, a indicatorilor acordului în raport cu un set de definiții de referință. Acest studiu a efectuat atât o evaluare a variabilității totale a măsurătorii cantitative între replicate, cât și contribuția diferiților factori incluși în studiu la variabilitatea acestor măsurători cantitative prin intermediul analizei componentelor de variație. [Tabelul 23](#) rezumă măsurătoarea cantitativă utilizată în analiza fiecărui tip de variantă, precum și factorii care au fost evaluați pentru contribuția la variabilitatea în măsurătoarea cantitativă.

Tabelul 23 Rezumatul măsurătorilor cantitative utilizate la evaluarea preciziei pentru diferențele dintre tipurile de variante

Tip de variantă	Parametri cantitativi	Factori evaluați pentru contribuția la variabilitate
Variante mici	APA și ANA	Operator, lot kit pregătire bibliotecă, instrument, lot consumabile secvențiere, subtip variantă, context genomic
CNV-uri	Profunzime normalizată a acoperirii peste regiunea CNV	Operator, lot kit pregătire bibliotecă, instrument, lot consumabile secvențiere, subtip variantă, lungime variantă
ROH	Scorul ROH în regiunea ROH	Operator, lot kit pregătire bibliotecă, instrument, lot consumabile secvențiere, subtip variantă, lungime variantă
Extindere STR	Estimare dimensiune STR	Operator, lot kit pregătire bibliotecă, instrument, lot consumabile secvențiere, centru STR, lungime STR
Detectare SMN1 c.840C	Raportul de probabilitate logaritmică pentru prezența alelei de referință (C) în poziția țintă	Operator, lot kit pregătire bibliotecă, instrument, lot consumabile secvențiere, status SMA
SNV mitocondrial	Frecvența alelelor variantei	Operator, lot kit pregătire bibliotecă, instrument, lot consumabile secvențiere, poziție variantă, frecvență alelă variantă preconizată

Rezultatele analizei componentelor variației sunt prezentate în [Tabelul 24](#). Pentru variantele mici, majoritatea varianței a fost atribuită erorii reziduale și nu a fost explicată de factorii legați de analiză incluși în design, inclusiv lotul de truse de secvențiere, instrumentul de secvențiere, lotul de truse de pregătire a bibliotecii, operatorul și de la rulare la rulare. Singura excepție a fost observată pentru SNV în regiunile de încredere intermediare pentru care majoritatea divergenței a fost atribuită lotului de truse de secvențiere. În general, o mai mare divergență a fost atribuită factorilor asociați analizei pentru variantele mici din regiunile cu încredere scăzută ale genomului. Pentru toate celelalte tipuri de variante, majoritatea divergenței a fost atribuită erorii reziduale și nu factorilor legați de analiză. Acest studiu demonstrează că, pentru majoritatea subtipurilor de variante mici, filtrarea pentru regiunile de încredere ridicate și intermediare din genom poate fi utilizată pentru a crește repetabilitatea și a reduce variabilitatea analizei. [Reproductibilitate externă la pagina 59](#) oferă o analiză cuprinzătoare a reproductibilității analizei.

Tabelul 24 Rezultatele studiului de analiză a componentelor divergenței

Metrică	Subtipuri de variante	Nivel de încredere	Rezidual	Lot trusă de secvențiere	De la rulare la rulare	Instrument	Lot de truse de pregătire a bibliotecii	Operator
APA	Deleție scurtă (1-5 bp)	Ridicat	79,36%	17,52%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
		Intermediar	76,97%	18,59%	1,53%	0,00%	2,91%	0,00%
		Jos	67,85%	24,87%	4,4%	0,00%	2,88%	0,00%
	Deleție medie (6-15 bp)	Intermediar	61,17%	29,06%	7,42%	0,00%	2,35%	0,00%
		Jos	59,33%	31,76%	6,38%	0,17%	2,35%	0,00%
	Deleție lungă (16-31 bp)	Intermediar	52,93%	33,72%	11,67%	0,17%	1,51%	0,00%
		Jos	49,10%	37,01%	11,08%	1,42%	1,39%	0,00%
	Insertie scurtă (1-5 bp)	Ridicat	89,93%	7,32%	1,76%	0,00%	0,99%	0,00%
		Intermediar	74,52%	19,96%	3,44%	0,00%	2,08%	0,00%
		Jos	60,64%	29,72%	8,49%	0,00%	1,15%	0,00%
	Insertie medie (6-15 bp)	Intermediar	81,76%	15,78%	0,00%	0,00%	2,41%	0,06%
		Jos	51,28%	35,07%	12,07%	0,00%	1,58%	0,00%
	Insertie lungă (16-31 bp)	Intermediar	87,59%	9,83%	1,18%	0,00%	1,40%	0,00%
		Jos	52,47%	35,32%	10,14%	0,23%	1,85%	0,00%
	SNV	Ridicat	78,01%	17,45%	0,00%	0,13%	1,23%	3,17%
Intermediar		79,71%	16,95%	0,77%	0,20%	1,29%	1,09%	
Jos		56,63%	36,08%	6,97%	0,22%	0,00%	0,09%	
ANA	SNV	Ridicat	55,07%	21,84%	21,07%	1,80%	0,21%	0,00%
		Intermediar	28,53%	49,08%	20,11%	1,27%	1,00%	0,00%
		Jos	51,78%	36,04%	9,76%	2,42%	0,00%	0,00%

Metrică	Subtipuri de variante	Nivel de încredere	Rezidual	Lot trusă de secvențiere	De la rulare la rulare	Instrument	Lot de truse de pregătire a bibliotecii	Operator
Adâncime	CÂȘTIG CNV (10 kbp, 25 kbp)	Nu se aplică	73,28%	2,87%	0,00%	0,00%	1,01%	0,00%
	CÂȘTIG CNV (25 kbp, 50 kbp)	Nu se aplică	72,99%	5,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,56%
	CÂȘTIG CNV (50 kbp, 100 kbp)	Nu se aplică	66,40%	5,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CÂȘTIG CNV (100 kbp, 500 kbp)	Nu se aplică	43,51%	14,92%	14,01%	0,20%	0,00%	15,72%
	PIERDERE CNV (10 kbp, 25 kbp)	Nu se aplică	83,41%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PIERDERE CNV (25 kbp, 50 kbp)	Nu se aplică	84,67%	1,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PIERDERE CNV (50 kbp, 100 kbp)	Nu se aplică	84,16%	2,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PIERDERE CNV (100 kbp, 500 kbp)	Nu se aplică	81,25%	5,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,55%

Metrică	Subtipuri de variante	Nivel de încredere	Rezidual	Lot trusă de secvențiere	De la rulare la rulare	Instrument	Lot de truse de pregătire a bibliotecii	Operator
Punctaj peste regiune	ROH (1 kbp, 10 kbp)	Nu se aplică	74,32%	1,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,52%
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	Nu se aplică	84,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	Nu se aplică	84,92%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	Nu se aplică	85,63%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	Nu se aplică	85,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH \geq 500 kbp	Nu se aplică	84,81%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Metrică	Subtipuri de variante	Nivel de încredere	Rezidual	Lot trusă de secvențiere	De la rulare la rulare	Instrument	Lot de truse de pregătire a bibliotecii	Operator
Estimarea dimensiunii pentru locii STR1	AFF2	Nu se aplică	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ATXN7	Nu se aplică	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ATXN7_GCC	Nu se aplică	99,43%	0,57%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP	Nu se aplică	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP_CA	Nu se aplică	95,45%	4,55%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CSTB	Nu se aplică	96,45%	0,87%	2,57%	0,00%	0,00%	0,11%
	DIP2B	Nu se aplică	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	FMR1	Nu se aplică	71,02%	10,06%	0,00%	17,33%	0,64%	0,95%
	FXN_A	Nu se aplică	94,52%	1,37%	0,00%	1,37%	1,37%	1,37%
	HTT	Nu se aplică	82,23%	0,00%	11,99%	3,81%	0,00%	1,97%
	HTT_CCG	Nu se aplică	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	NOTCH2NL	Nu se aplică	99,43%	0,00%	0,00%	0,29%	0,29%	0,00%
	TBP	Nu se aplică	90,91%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Raport de probabilitate de înregistrare	c.840C în NA03814	Nu se aplică	65,71%	18,98%	0,00%	0,00%	0,00%	15,32%
	c.840C în NA23686	Nu se aplică	87,64%	0,00%	0,00%	5,90%	0,00%	6,46%
VAF	SNVmt în apropierea LOD	Nu se aplică	83,13%	0,37%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%

¹ Analiza componentelor variației nu a fost efectuată pentru loci pentru care nu s-a observat nicio variație.

Prospect

Reproductibilitate externă

Reproductibilitatea externă a fost determinată utilizând un singur lot de reactivi de pregătire și secvențiere a bibliotecii la trei centre de studiu externe, cu doi operatori la fiecare centru. Aceleași probe utilizate în studiul de [Precizie intralaborator la pagina 51 \(Tabelul 21\)](#) au fost utilizate în studiul de reproductibilitate cu o singură excepție: proba NA20241 a fost înlocuită cu NA20239 pentru a evalua expansiunea FMR1 loci STR la LoD scăzută. În total, 16 probe unice au fost testate ca două sub-panouri cu opt probe unice fiecare (Panoul A și Panoul B) de către fiecare operator de la fiecare centru. Trei rulări de secvențiere au fost efectuate pentru bibliotecile duplicate ale fiecărui sub-panou, pentru un total de 36 de rulări de secvențiere per probă unică.

Rata de transfer a probelor în 576 de biblioteci de probe cu rulări de secvențiere valide, definită ca numărul de probe care au trecut de parametrii QC ai bibliotecii de probe la prima încercare, a fost de 99,1% (571/576; Î 95%: 98,0%, 99,6%). Toate rezultatele testelor se bazează pe testarea inițială.

Reproductibilitatea SNV-urilor, inserțiile, delețiile, CNV-urile și ROH-urile (ROH, region of homozygosity - regiune de homozigotism) a fost evaluată prin compararea datelor cu un set de definiții de referință pe baza performanței obișnuite în trei rulări de caracterizare ([Tabelul 25](#) și [Tabelul 26](#)). Reproductibilitatea extinderilor STR, absența alelei SMN1 c.840C și SNVmt a fost evaluată prin compararea datelor cu starea cunoscută ([Tabelul 27](#)).

Tabelul 25 Reproductibilitatea TruSight Whole Genome pentru SNV-uri, CNV-uri și ROH

Tipul variantei — stratificare	Definiri pozitive consecvente ¹ / Definiri pozitive ²			Acord pozitiv mediu (%) (Îl 95%) ³
	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	
Variante mici (încredere ridicată)				
SNV-uri	687.996.150 /	666.509.635 /	688.001.697 /	99,9
	688.770.402	667.253.493	688.766.887	(99,9 - 99,9)
Insertii — 1-5 bp	34.087.135 /	33.025.772 /	34.089.204 /	99,9
	34.137.298	33.073.087	34.137.792	(99,9 - 99,9)
Deleții — 1-5 bp	44.096.186 /	42.733.935 /	44.102.515 /	99,6
	44.255.442	42.883.089	44.256.695	(99,6-99,6)
Variante mici (încredere intermediară)				
SNV-uri	42.238.226 /	40.920.370 /	42.236.751 /	98,8
	42.737.228	41.391.560	42.725.827	(98,8-98,9)
Insertii — 1-5 bp	11.075.073 /	10.734.488 /	11.080.468 /	98,9
	11.204.210	10.855.790	11.204.818	(98,9 - 99,9)
Insertii — 6-15 bp	4.307.181 /	4.173.626 /	4.308.408 /	99,3
	4.339.975	4.205.261	4.340.277	(99,2 - 99,3)
Insertii — ≥ 16 bp	611.952 /	593.114 /	612.222 /	96,8
	632.214	612.877	632.498	(96,8 - 9,8)
Deleții — 1-5 bp	24.571.502 /	23.814.655 /	24.586.095 /	98,9
	24.851.492	24.076.930	24.855.041	(98,9 - 98,9)
Deleții — 6-15 bp	8.737.319 /	8.473.410 /	8.746.773 /	98,2
	8.900.796	8.624.403	8.902.016	(98,2 - 98,2)
Deleții — ≥ 16 bp	3.590.282 /	3.481.192 /	3.594.420 /	95,0
	3.779.907	3.662.448	3.780.659	(95,0 - 95,0)
Variante mici (încredere scăzută)				
SNV-uri	78.507.103 /	76.365.789 /	78.863.977 /	81,2
	96.859.682	94.066.720	97.058.652	(81,2-81,2)

Tipul variantei — stratificare	Definiri pozitive consecvente ¹ / Definiri pozitive ²			Acord pozitiv mediu (%) (ÎI 95%) ³
	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	
Insertii — 1-5 bp	17.312.805 /	16.859.987 /	17.406.355 /	89,6
	19.370.351	18.807.745	19.418.516	(89,5 - 89,6)
Insertii — 6-15 bp	5.543.985 /	5.404.652 /	5.584.241 /	85,1
	6.529.886	6.338.556	6.550.066	(85,1 - 85,2)
Insertii — ≥ 16 bp	3.284.197 /	3.205.165 /	3.314.025 /	77,0
	4.275.286	4.158.315	4.298.399	(77,0-77,0)
Deleții — 1-5 bp	31.659.416 /	30.751.952 /	31.746.379 /	92,7
	34.194.748	33.158.757	34.226.245	(92,7-92,7)
Deleții — 6-15 bp	9.189.220 /	8.928.794 /	9.217.516 /	92,1
	9.987.568	9.684.179	9.995.101	(92,1-92,2)
Deleții — ≥ 16 bp	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 — creșteri ≥ 10 kbp	7.883 /	7.664 /	7.916 /	95,5
	8.275	8.012	8.282	(95,2-95,8)
CNV-uri — pierderi ≥ 10 kbp	11.517 /	11.248 /	11.516 /	95,3
	12.089	11.777	12.113	(95,1-95,5)
ROH — ≥ 500 kbp	6.641 /	6.519 /	6.616 /	98,0
	6.765	6.663	6.756	(97,8 - 98,2)

¹ Numărul total de definiri pozitive consecvente = Interogare consecventă pozitivă (QCP) + Referință consecventă pozitivă (RCP).

² Numărul total de definiri pozitive = Interogare consecventă pozitivă (QCP) + Interogare exclusivă pozitivă (QEP) + Referință consecventă pozitivă (RCP) + Exclusiv referință pozitivă (REP).

³ 95% interval de încredere bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 26 Reproductibilitatea TruSight Whole Genome pentru ANA pentru SNV-uri, CNV-uri și ROH

Tipul variantei — stratificare	Definiri negative consecvente ¹ / Definiri negative ²			Acord negativ mediu (%) (Î 95%) ³
	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	
Variante mici (încredere ridicată)	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%)
Variante mici (încredere intermediară)	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)
Variante mici (încredere scăzută)	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 — creșteri ≥ 10 kbp	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-uri — pierderi ≥ 10 kbp	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 kbp	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 Numărul total de definiri negative consecvente = 2 × Concordant negativ (CN).

² Numărul total de definiri negative = 2 × Negativ consecvent (CN) + Negativ exclusiv de referință (REN) + Negativ exclusiv de interogare (QEN).

³ 95% interval de încredere bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 27 Reproductibilitatea TruSight Whole Genome pentru STR, SMN1 și SNVmt

Tipul variantei — stratificare	Total definiri pozitive preconizate	Definiri pozitive			Total definiri negative preconizate	Definiri negative			Procentaj definiri pozitive (ÎI 95%) ¹	Procentaj deteçii negative (ÎI 95%) ¹
		Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3		Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3		
Extinderi STR - Nivel ridicat de deteçie (2x-4x LOD)										
Extinderi STR - FMR1	35	12	11	12	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	100 (90,1- 100)	Nu se aplică
Extinderi STR - HTT	36	12	12	12	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	100 (90,4- 100)	Nu se aplică
Extinderi STR – FMR1 și HTT combinat	71	24	23	24	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	100 (94,9- 100)	Nu se aplică
Extinderi STR - Nivel ridicat de deteçie (1x-1,5x LOD)										
Extinderi STR - FMR1	36	11	10	11	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	88,9 (74,7- 95,6)	Nu se aplică
Extinderi STR - HTT	36	12	12	12	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	100 (90,4- 100)	Nu se aplică
Extinderi STR – FMR1 și HTT combinat	72	23	22	23	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	94,4 (86,6- 97,8)	Nu se aplică

Tipul variantei — stratificare	Total definiri pozitive preconizate	Definiri pozitive			Total definiri negative preconizate	Definiri negative			Procentaj definiri pozitive (Î 95%) ¹	Procentaj detectii negative (Î 95%) ¹
		Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3		Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3		
Extinderi STR – 28 de loci țintă principali STR combinați	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	285	96	93	96	Nu se aplică	100 (98,7- 100)
Absența SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9- 100)	100 (98,7- 100)
SNVmt – nivel ridicat (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%)
SNVmt – nivel scăzut (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 Interval de încredere 95% bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

Depanare

Pentru depanarea problemelor din fluxul de lucru, urmați instrucțiunile din tabelul de mai jos. Dacă o rulare de secvențiere sau o pregătire a bibliotecii pentru o probă eșuează de două ori, este posibil să fie necesară o depanare suplimentară. Contactați Departamentul de asistență tehnică Illumina.

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Rulare problemă de creare	Rularea planificată asociată nu poate fi selectată manual în Software de control NovaSeq 6000Dx după încărcarea consumabilelor	A fost specificat un ID incorect al eprubetei din bibliotecă în timpul planificării rulării	Consultați Rulare revizie în Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931).

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Problemă cu secvențierea.	Stare eșec secvențiere în Illumina Run Manager	Executarea secvențierii a fost abandonată sau nu a reușit să se finalizeze din cauza NovaSeq 6000Dx sau a unei probleme de manipulare a consumabilelor	<p>Consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105).</p> <p>După rezolvarea problemei, biblioteca poate fi grupată și secvențiată din nou până la o singură dată (din cauza volumului).</p>
		Executare finalizată, dar nu s-a grupat. NovaSeq 6000Dx Problemă posibilă, problemă de manipulare a consumabilelor de secvențiere sau eroare catastrofală de pregătire a bibliotecii din cauza problemei de manipulare a reactivului sau a erorii operatorului (de exemplu, s-a sărit peste un pas sau s-a eliminat în loc de supernatantul transferat în timpul selectării dimensiunii)	<p>Evaluarea randamentelor bibliotecii individuale în FLP prin qPCR pentru $\geq 0,94$ nM (presupunând o mărime a inserției de 450 bp) pentru a stabili preparația bibliotecii în/în afara acesteia comparativ cu problemele legate de secvențiere.</p> <p>Dacă problemele de pregătire a bibliotecii sunt excluse și se suspectează o problemă legată de secvențiere, consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105).</p> <p>Dacă se suspectează o problemă de pregătire a bibliotecii, consultați Sfaturi și tehnici la pagina 13 și Instrucțiunile de utilizare la pagina 15 înainte de a repeta pregătirea și secvențierea bibliotecii. Dacă există erori repetate, contactați departamentul de asistență tehnică Illumina.</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Secvențierea datelor nu a reușit să se transfere pe server	Status eșuare secvențiere a transferului de fișiere pentru analiză în Illumina Run Manager	Problemă de conectivitate la rețea sau întrerupere a alimentării instrumentului sau serverului în timpul rulării transferului de date	<p>Verificați dacă există întreruperi de alimentare sau pierderi de conectivitate la rețeaua instrumentului. Așteptați ca sistemul să fie inactiv (secvențierea să se finalizeze), apoi accesați Setări instrument, SETĂRI IVD pentru a confirma conexiunea la locația de ieșire specificată utilizând funcția Răsfoire.</p> <p>Dacă este necesară depanarea suplimentară, consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105). Dacă după rezolvarea problemelor legate de conexiune sau alimentare, transferul de fișiere nu repornește și nu se finalizează, contactați departamentul de asistență tehnică Illumina.</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Analiza nu a început	Analiza nu a început în Illumina Run Manager deși transferul fișierului de secvențiere pentru analiză a fost finalizat	Asocierea sau conexiunea dintre instrument și DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx este pierdută sau DRAGEN a expirat licența.	<p>Așteptați ca sistemul să fie inactiv (să se finalizeze secvențierea), apoi mergeți la DRAGEN pentru a confirma că licența DRAGEN este validă. Dacă licența a expirat, contactați Illumina. Dacă licența este validă, selectați Run self-test (Rulare autotestare). Dacă testul eșuează sau dacă opțiunea de a rula o autotestare nu este disponibilă, conectați-vă la Instrument pentru a verifica dacă există o eroare legată de asocierea serverului. Consultați secțiunea Configurare sistem a Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105).</p> <p>Analiza trebuie să înceapă automat după rezolvarea problemei. Ieșiți din pagină și navigați la fila Actie runs (Rulări active) pentru a confirma că analiza este în curs. Dacă problema persistă, contactați Illumina.</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Analiza se blochează	Analiză în curs de desfășurare în Illumina Run Manager pentru mult mai mult timp decât se preconiza	Este posibil ca conectivitatea la rețea sau alimentarea instrumentului sau a serverului să fi fost întreruptă în timpul analizei, cauzând blocarea analizei	<p>Anulați analiza și verificați dacă există întreruperi ale alimentării sau pierderi de conectivitate la rețeaua instrumentului.</p> <p>Așteptați ca sistemul să fie inactiv (secvențierea să se finalizeze), apoi accesați Instrument setting (Setări instrument) (SETĂRI IVD) și confirmați conectivitatea la locația de ieșire specificată. Dacă este necesară depanarea suplimentară, consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105).</p> <p>După soluționarea problemei, solicitați analiza fără modificări. Consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931).</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Fișierele de analiză nu au putut fi transferate	Transferul fișierului de analiză la stocare a eșuat în Illumina Run Manager	Problemă de conectivitate la rețea sau întrerupere a alimentării instrumentului sau serverului în timpul transferului fișierului de analiză	<p>Anulați analiza și verificați dacă există întreruperi ale alimentării sau pierderi de conectivitate la rețeaua instrumentului.</p> <p>Așteptați ca sistemul să fie inactiv (secvențierea să se finalizeze), apoi accesați Instrument setting (Setări instrument) (SETĂRI IVD) și confirmați conectivitatea la locația de ieșire specificată. Dacă este necesară depanarea suplimentară, consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105).</p> <p>După soluționarea problemei, solicitați analiza fără modificări. Consultați Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931).</p>
Analiza nu reușește la resolicitare	Analiza nu a reușit după resolicitare	Dacă se recuperează analiza, este posibil ca executarea inițială să fi fost ștearsă sau arhivată și să nu mai fie în locația specificată pentru locația de stocare externă	Verificați dacă executarea inițială este încă în locația de stocare externă. Dacă este arhivată, recuperați din arhivă și apoi retrimiteți analiza în coadă.
Sequencing QC fails (CC pentru secvențiere nu a reușit)	Rezumat EȘEC rezultat CC pentru secvențiere în raportul consolidat	„Total % >=Q30” sub specificația analitică din cauza manipulării greșite a consumabilelor de secvențiere (nedezghețarea completă sau răsturnarea pentru amestecare după dezghețare)	Consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105). După rezolvarea problemei, biblioteca poate fi grupată și secvențiată din nou până la o singură dată (din cauza volumului).

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Controlul calității FASTQ eșuează pentru toate probele	Rezumat rezultat CC FASTQ și rezumat EȘUARE CC bibliotecă de probe, cu rezultate metrice ale CC a bibliotecii individuale raportate ca ND, pentru toate probele din Raportul consolidat cu rezumatul rezultatului cu succes al CC de secvențiere	Kitul adaptor pentru index specificat în timpul creării rulării nu este aliniat cu cel utilizat în timpul pregătirii bibliotecii	Vizualizați probele pentru a revizui informațiile de indexare utilizate în analiza din IRM. Dacă este necesară o corecție, consultați Requeue Analysis (Retrimiterere analiză în coadă) din Ghid pentru TruSight Whole Genome Analysis Application (nr. document 200049931).

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
CC FASTQ eșuează pentru una sau mai multe probe în absența randamentului scăzut de rulare; Randament total neindexat (GB) \geq 2800 GB pe S4 sau \geq 1000 GB pe S2	Rezumat rezultat CC FASTQ și rezumat EȘUARE CC bibliotecă de probe, cu rezultate metrice ale CC a bibliotecii individuale raportate ca ND, pentru una sau mai multe, dar nu pentru toate probele din Raportul consolidat fără randamentul rulării reduce	Erori de utilizare în timpul pregătirii sau cumulării bibliotecii	<p>Evaluati volumul (volumele) rămas(e) în placa finală a bibliotecii (FLP) pentru a confirma eroarea de utilizare a omiterii probelor din bibliotecile grupate. Volumul permite operatorului să cumuleze din nou și să resecvențieze până la o singură dată. Alternativ, recuperați probele eșuate din următorul lot de pregătire a bibliotecii și rulați după revizuirea Instrucțiuni de utilizare la pagina 15.</p> <p>Evaluati randamentele bibliotecii individuale în FLP prin qPCR pentru \geq 0,94 nM (presupunând o mărime a inserției de 450 bp) pentru a include/exclude problemele legate de preparția bibliotecii. Recuperați probele eșuate din următorul lot de pregătire a bibliotecii și rulați după revizuirea Instrucțiuni de utilizare la pagina 15.</p> <p>Nu se recomandă gruparea bibliotecilor între loturile de pregătire a bibliotecii din cauza fluctuațiilor de la lot la lot ale volumelor care pot avea ca rezultat un procent CV mai mare și o incidență mai mare a eșecului „Acoperirii autozomale medii”.</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Controlul calității FASTQ eșuează pentru unele nu toate probele cu randament de rulare scăzut; Randament total neindexat (GB) scăzut, < 2800 GB pe S4 sau < 1000 GB pe S2	Rezumat rezultat CC FASTQ și rezumat EȘUARE CC bibliotecă de probe, cu rezultate metrice ale CC a bibliotecii individuale raportate ca ND, pentru una sau mai multe, dar nu pentru toate probele din Raportul consolidat cu randamentul rulării reduce	Poate indica o problemă legată de pregătirea bibliotecii sau de secvențiere	<p>Evaluarea randamentelor bibliotecii individuale în FLP prin qPCR pentru $\geq 0,94$ nM (presupunând o mărime a inserției de 450 bp) pentru a stabili preparația bibliotecii în/în afara acesteia comparativ cu problemele legate de secvențiere.</p> <p>Dacă se suspectează o problemă de secvențiere, consultați Documentația produsului NovaSeq 6000Dx Instrument (nr. document 200010105). După rezolvarea problemei, bibliotecile pot fi regrupate și resecvențiate până la o singură dată (din cauza volumului limitat).</p> <p>Dacă se suspectează o problemă de pregătire a bibliotecii, consultați Sfaturi și tehnici la pagina 13 și Instrucțiuni de utilizare la pagina 15 înainte de a repeta pregătirea și secvențierea bibliotecii. Dacă există erori repetate, contactați departamentul de asistență tehnică Illumina.</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
CC al bibliotecii eșuează din cauza acoperirii reduse	Rezumat EȘEC rezultat CC bibliotecă de probe pentru una sau mai multe probe din Raportul consolidat din cauza acoperirii autozomale medii și/sau a procentajului de autozom cu acoperire mai mare de 20X și/sau acoperirii mitocondriale medii față de genom care nu depășește specificația analitică	Problemă (probleme) privind calitatea probelor sau pregătirea bibliotecii	<p>Efectuați re-cuantificarea cu ajutorul controalelor de proces pentru a exclude problemele legate de introducerea ADN-ului.</p> <p>Revizuiți Sfaturi și tehnici la pagina 13 de revizuire și Instrucțiuni de utilizare la pagina 15 înainte de a resolicita proba (probele) eșuate în următorul lot de pregătire a bibliotecii și de a rula. Dacă există eșec(uri) repetat(e) pentru aceeași probă(e), acest lucru poate indica o problemă(e) de calitate a probei.</p> <p>Dacă se observă din nou o defecțiune, dar cu probe diferite, acest lucru poate indica o problemă legată de pregătirea bibliotecii cu privire la operator, reactiv, consumabil sau echipament. Dacă problema persistă, contactați departamentul de asistență tehnică Illumina.</p>

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
CC al bibliotecii eșuează pe baza decalajului GC	Rezumat EȘEC rezultat CC bibliotecă de probe pentru una sau mai multe probe din Raportul consolidat din cauza acoperirii normalizate la compartimente GC de 60% până la 79% și/sau a acoperirii normalizate la compartimente GC de 20% până la 39% care nu respectă specificația analitică	Reportare excesivă a ELM sau spălarea omisă care cauzează decalaje GC în acoperire	Revizuiți Sfaturi și tehnici la pagina 13 și Instrucțiuni de utilizare la pagina 15 înainte de a resolicita proba (probele) eșuate în următorul lot de pregătire a bibliotecii și de a rula.
Controlul calității bibliotecii eșuează din cauza contaminării pentru una sau mai multe, dar nu pentru toate probele din rulare	Rezumat EȘEC rezultat CC bibliotecă de probe pentru una sau mai multe probe, dar nu toate probele din Raportul consolidat din cauza contaminării estimate a probei care nu respectă specificațiile analitice	Probă(e) contaminată(e) sau nu s-au modificat vârfulurile în timpul pregătirii probei sau bibliotecii	Revizuiți Sfaturi și tehnici la pagina 13 și Instrucțiuni de utilizare la pagina 15 înainte de a retrimite proba (probele) eșuate în coadă în următorul lot de pregătire a bibliotecii și de a rula. Dacă există eșec(uri) repetate pentru aceeași (aceleași) probă(e), ADN-ul probei poate fi contaminat.

Tip problemă	Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Controlul calității bibliotecii eșuează din cauza contaminării pentru toate probele din rulare	Rezumat rezultatul CC bibliotecă de probe este raportat ca EȘEC pentru toate probele din Raportul consolidat din cauza contaminării estimate a probei care nu respectă specificațiile analitice	Reactiv contaminat sau nu s-au modificat vârfulurile în timpul diluării probei sau a pregătirii bibliotecii	Revizuiți <i>Sfaturi și tehnici la pagina 13</i> pentru a evita contaminarea. Retrimiteți în coadă probele eșuate în următorul lot de pregătire a bibliotecii și rulați utilizând diluții de probe proaspete și kit de pregătire a bibliotecii.
Rezumat rezultat ploidie ND	Rezumatul rezultatelor de ploidie raportat ca ND (nedeterminat) în Raportul consolidat	Sexul a fost listat ca Necunoscut în timpul creării rulării	Confirmați că „Sex furnizat ploidie cromozomială” în Raportul consolidat a fost „Necunoscut”. Se recomandă să se menționeze Sexul ca „Masculin” sau „Feminin” în datele probei atunci când este cunoscut în timpul Creării rulării.
		DRAGEN a raportat un rezultat de ploidie sexuală diferit de XX sau XY, cum ar fi X0 sau XXY	Revizuiți rezultatul „estimării ploidiei” de DRAGEN în Raportul consolidat.
Rezumatul rezultatelor de ploidie DISCORDANT	Rezumatul rezultatelor de ploidie raportat ca ND (nedeterminat) în Raportul consolidat	Problemă potențială de schimbare a probei	Revizuire pentru a confirma că datele probei introduse în timpul creării rulării au fost corecte. Dacă este incorectă, solicitați analiza cu modificări. Dacă este corectă și se suspectează o problemă legată de schimbarea probei, se recomandă să retrimiteți în coadă proba (probele) DISCORDANT (E) în următorul lot de pregătire a bibliotecii și să rulați pentru a evita raportarea unor rezultate greșite. Software-ul pentru probă nu aplică eșecul pentru o probă cu un rezumat al rezultatului ploidian DISCORDANT.

Referințe

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. Epub 2022 Apr 21. 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. Epub 2010 Feb 24. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28 octombrie 1998 [actualizat la 16 noiembrie 2023]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *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. Epub 2015 Oct 20. 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. Epub 2011 Sep 21. 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. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia.* 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Epub 2007 Nov 19. 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. Epub 2012 May 30. 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. Epub 2014 Sep 17. 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 ABP, 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. Epub 2012 Sep 19. 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. Erată în: *Nat Genet* 2002 Jan;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. Epub 2011 Jun 16. 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. Epub 2012 Apr 3. 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. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Secvențierea pe termen lung identifică expansiunile repetate ale GGC în NOTCH2NLC asociate cu boala de includere neuronală intranucleară. *Nat Genet*. 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Epub 2019 Jul 22. 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. Epub 2003 Mar 17. PMID: 12640453.

Anexa A

Setare index S4 1

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
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

Setare index S4 2

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
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

Setare index S2 1

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

Setare index S2 2

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

Setare index S2 3

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

Setare index S2 4

ID godeu placă index	Nume index	i7 Baze	i5 Baze
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

Anexa B

Calculare suplimentare pentru Opțiunea 1: Intrare ADN 280 ng pentru metodele de cuantificare Quant și Qubit cu interval larg

Calcularea limitelor de concentrație pentru concentrația stocului de ADN de 11,2 până la 154,0 ng/μl:

Concentrația minimă se bazează pe o introducere de ADN de 280,0 ng / 25,0 μl volum = 11,2 ng/μl.

Pe baza unui volum minim de pipetare de 2,0 μl, concentrația maximă este de $280 \text{ ng} \times 1,1$ (suprapunere 10%) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, într-un volum total de 27,5 μl.

Exemple de calcule cu o introducere de ADN de 280,0 ng

Exemplu lucrat pentru concentrația stocului de ADN = 95,0 ng/μl:

- Volum stoc ADN (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, rotunjiri la 3,24 μl pentru pipetare precisă cu P-10.
- Volumul total de ADN diluat este fixat la 27,5 μl.
- Volum RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, rotunjiri la 24,3 μl pentru pipetare precisă cu P-200.

Exemplu lucrat pentru concentrația stocului de ADN = 308,0 ng/μl:

- Volumul stocului de ADN (μl) este fixat la 2,0 μl
- Volumul total de ADN diluat (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- Volum RSB (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Calculare suplimentare pentru Opțiunea 2: Introducere ADN 350 ng pentru metoda de cuantificare Accuclear Ultra High Sensitivity

Calcularea limitelor de concentrație pentru concentrația stocului de ADN de 14,0 până la 192,5 ng/μl:

Concentrația minimă se bazează pe o introducere de ADN de 350,0 ng / 25,0 μl volum = 14,0 ng/μl.

Pe baza unui volum minim de pipetare de 2,0 μl, concentrația maximă este de $350 \text{ ng} \times 1,1$ (suprapunere 10%) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Exemple de calcule cu o introducere de ADN de 350,0 ng

Exemplu lucrat pentru concentrația stocului de ADN = 118,75 ng/μl:

- Volum stoc ADN (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, rotunjiri la 3,24 μl pentru pipetare precisă cu P-10.
- Volumul total de ADN diluat este fixat la 27,5 μl.

- Volum RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, rotunjiri la $24,3 \mu\text{l}$ pentru pipetare precisă cu P-200.

Exemplu lucrat pentru concentrația stocului de ADN = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$:

- Volumul stocului de ADN (μl) este fixat la $2,0 \mu\text{l}$
- Volumul total de ADN diluat (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Volum RSB (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Istoricul versiunilor

Document	Data	Descrierea modificării
Nr. document 200050132 v00.1	Mai 2024	Volum de intrare corectat pentru metoda de cuantificare Accuclear Ultra High Sensitivity.
Document nr. 200050132 v00	Aprilie 2024	Versiunea inițială.

Prospect

Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul acestuia constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliațiilor săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, al mărcilor sale comerciale, al drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricărui terți prin acest document.

Instrucțiunile din acest document trebuie respectate în mod strict și explicit de către personalul calificat și corespunzător instruit pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului descris/produselor descrise în acest document. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

NERESPECTAREA OBLIGAȚIEI DE A CITI COMPLET ȘI DE A RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU A ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

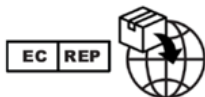
© 2024 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați www.illumina.com/company/legal.html.

Informații de contact



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 S.U.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponsor australian

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

Etichetarea produsului

Pentru referințe complete privind simbolurile afișate pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor la adresa support.illumina.com în fila *Documentation* (Documentație) corespunzătoare setului dvs.