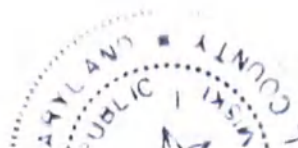


Sequencer nucleic acids NextSeq™ 550Dx, a new generation sequencing method (NGS)

I, Hanadi Ajami, hereby certify
that this is an original document.



263673

State of Maryland, Anne Arundel County, Sct.

I, **SCOTT A. POYER**, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that **Ahmad Miski** was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 10th day of May, 2021.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the court September 22, 2022

Scott A. Poyer

Scott A. Poyer, Clerk
Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland



illumina

Sequencer nucleic acids NextSeq™ 550Dx, a new generation sequencing method (NGS)

I, Hanadi Ajami, hereby certify
that this is an original document.

State of Maryland, Anne Arundel County
Subscribed and Sworn to before me by
Hanadi Ajami.

Ahmed Miskl
Notary Public

SEP 22 2022
My Commission expires on May 28, 2025



User manual

Manufacturer:

Illumina, Inc

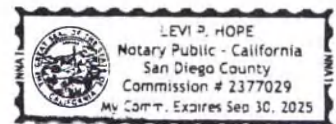
Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA

On behalf of Illumina, Inc.


Aurelia Brownridge
Sr. Regulatory Affairs Specialist

Date September 22, 2022



CALIFORNIA ACKNOWLEDGMENT

CIVIL CODE § 1189

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California

County of SAN DIEGO

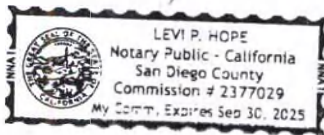
On 09/22/2022 before me, LEVI P. HOPE, NOTARY PUBLIC
Date Here Insert Name and Title of the Officer

personally appeared AURELIA BROWNRIDGE
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person~~s~~ whose name~~s~~ is~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he~~/she/they~~ executed the same in his~~/her/their~~ authorized capacity~~(ies)~~, and that by his~~/her/their~~ signature~~s~~ on the instrument the person~~s~~, or the entity upon behalf of which the person~~s~~ acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.



Place Notary Seal and/or Stamp Above

Signature Levi Hope
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Completing this information can deter alteration of the document or fraudulent reattachment of this form to an unintended document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: USER MANUAL

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer – Title(s): _____

☐ Partner – ☐ Limited ☐ General

☐ Individual

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer – Title(s): _____

☐ Partner – ☐ Limited ☐ General

☐ Individual

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Кат. № 20005715

Назначение

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS) предназначен для секвенирования библиотек ДНК при использовании наборов реагентов для диагностики *in vitro*. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используется с наборами реагентов: "Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот" и "Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот" при использовании с медицинскими изделиями, такими как: "Набор для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения", "Система неинвазивного пренатального тестирования для определения множественных врожденных анеуплоидий ИВД VeriSeq™ NIPT Solution v2, анализ нуклеиновых кислот, в вариантах исполнения" и аналитическим программным обеспечением.

(Далее по тексту Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx).

Принципы процедуры

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx предназначен для секвенирования библиотек ДНК при использовании наборов для диагностики *in vitro*, для использования квалифицированным и обученным персоналом клинической лаборатории, который прошел подготовку в области проведения диагностических процедур *in vitro* в клинической лаборатории. В качестве входного материала в Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используются библиотеки, полученные из ДНК при добавлении к амплифицируемой мишени индексных последовательностей и последовательностей захвата. Библиотеки образцов захватываются в проточной ячейке, секвенирование проводится с использованием метода секвенирования путем синтеза (далее SBS, от sequencing by synthesis). В химической технологии SBS для обнаружения отдельных азотистых оснований нуклеотидов по мере их включения в растущие цепи ДНК используют метод обратимых терминаторов. Программное обеспечение анализа в реальном времени (RTA от RealTime Analysis) выполняет анализ изображений и распознавание нуклеотидов и присваивает каждому основанию при каждом цикле секвенирования показатель качества. По завершении первичного анализа прибор может провести вторичный анализ для распознавания оснований. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx использует различные вторичные модули анализа в зависимости от протокола. Для герминального и соматического модулей обработка данных включает в себя демультиплексирование, генерацию файла FASTQ, выравнивание, распознавание вариантов и создание файлов распознавания вариантов (форматы VCF от variant call format и gVCF от genomic variant call format). Файлы VCF и gVCF содержат информацию о вариантах, обнаруженных в конкретных позициях референтного генома.

Конфигурация с двухвариантной загрузкой

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx имеет конфигурацию двухвариантной загрузки, позволяющую использовать прибор в диагностическом (Dx) или исследовательском режиме (RUO от research use only). Секвенирование для диагностики *in vitro*, включая модули для герминальных и соматических вариантов, выполняется в диагностическом режиме. В диагностическом режиме следует использовать только реагенты IVD. Рабочие характеристики и ограничения процедуры для Секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx были установлены с использованием модулей для герминальных и соматических вариантов в диагностическом режиме.

Ограничения процедуры

- 1 Только для диагностики *in vitro*.
- 2 При использовании с набором реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот (не применимо для Российской Федерации), набором реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот модули для герминальных и соматических вариантов способны обеспечить следующее:
 - ▶ Объем получаемой информации после секвенирования ≥ 90 гигабайт (Gb).
 - ▶ Длина прочтения (парноконцевого прогона) 2 x 150 пар оснований (п.о.)
 - ▶ Оснований с качеством минимум Q30 ≥ 75 % при длине прочтения 2 x 150 п.о. 75 % оснований или более с показателем качества Phred ≥ 30 , что означает точность распознавания основания выше 99,9 %
- 3 Программное обеспечение метода не выравнивает прочтения с инделами (инсерциями, делециями или их комбинацией) при их длине > 25 п.о. Соответственно, программное обеспечение метода не выявляет инделы длиной > 25 п.о.
- 4 Программное обеспечение метода может не выравнивать прочтения для ампликонов со сложным составом, в результате чего область будет расценена как дикий тип. Под сложным составом подразумевают:
 - ▶ Прочтения с более чем тремя инделами
 - ▶ Прочтения длиной как минимум 30 п.о. с содержанием однонуклеотидного варианта (SNV) > 4 % от общей целевой длины ампликона (исключая области зонда)
 - ▶ Прочтения длиной < 30 п.о. с содержанием SNV > 10 % от общей длины ампликона (включая области зонда)
- 5 Большие вариации, включая многонуклеотидные варианты (MNV) и длинные инделы, в файле результатов VCF могут быть указаны как отдельные меньшие варианты.
- 6 Варианты с делециями могут быть отфильтрованы или пропущены, если делеция находится в области перекрытия ампликонов, если при этом длина делеции превышает или равна длине области перекрытия этих ампликонов.
- 7 Система не может обнаружить инделы, если они расположены непосредственно рядом с праймером и нет перекрывающего ампликона. В областях с перекрывающимися ампликонами анализ не позволяет выявлять делеции, если область перекрытия меньше размера имеющейся делеции. Например, если область перекрытия между двумя соседними ампликонами составляет два основания, анализ не может обнаружить какие-либо делеции, включающие оба этих основания. Для каждого из этих оснований делеция с одним из оснований может быть обнаружена.
- 8 Как и при любом протоколе приготовления библиотеки на основе гибридизации, имеющийся полиморфизм, мутации, инсерции или делеции в олигонуклеотид-связывающих областях могут влиять на исследуемые аллели и, следовательно, на распознавание при секвенировании. Например:
 - ▶ Вариант в фазе с вариантом в области праймера может не амплифицироваться, что приводит к ложноотрицательному результату.

- ▶ Варианты в области праймера могут предотвращать амплификацию референтного аллеля, что приводит к неправильному распознаванию варианта как гомозиготного.
 - ▶ Варианты с инделами в области праймера могут приводить к ложноположительному распознаванию в конце участка считывания, смежного с праймером.
- 9 Индел может быть отфильтрован из-за положения в цепи ДНК, если он расположен в конце одного прочтения и не учитывается при выравнивании.
 - 10 Малые MNV не валидированы и выносятся в результат только в модуле соматических вариантов.
 - 11 Делеции указаны в VCF по координате предшествующего основания в формате VCF. Поэтому рассмотрите смежные варианты, прежде чем сделать заключение, что нуклеотид распознан как гомозиготный референтный.
 - 12 Ограничения, специфичные для герминальных вариантов:
 - ▶ Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и модуль для герминальных вариантов Local Run Manager секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx предназначены для получения качественных результатов определения герминальных вариантов (т.е. гомозиготный, гетерозиготный, дикого типа).
 - ▶ При использовании модуля для герминальных вариантов минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного определения варианта, составляет 150x. Соответственно, требуется 150 фрагментов ДНК, что эквивалентно 300 перекрывающимся парным прочтениям. Число образцов и общее число анализируемых оснований влияют на покрытие. GC-состав и другие характеристики геномного состава влияют на покрытие.
 - ▶ Вариация числа копий может влиять на идентификацию варианта как гомозиготный или гетерозиготный.
 - ▶ Варианты в определенном повторяющемся контексте отфильтровываются в файлах VCF. Фильтр повторов RMxN используется для фильтрации вариантов, если вся или часть последовательности варианта неоднократно присутствует в референтном геноме рядом с позицией варианта. При распознавании герминального варианта требуется фильтрация как минимум девяти повторов в референтном геноме. Учитываются только повторы длиной до 5 п.о. (R5x9).
 - ▶ Индел и SNV в одном локусе могут привести к тому, что в ответ выносятся только один вариант.
 - 13 Ограничения, специфичные для соматических вариантов.
 - ▶ Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и модуль для соматических вариантов Local Run Manager секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx предназначены для получения качественных результатов распознавания соматических вариантов (т.е. наличия соматического варианта с частотой варианта, большей или равной 0,026 с пределом обнаружения 0,05).
 - ▶ При использовании модуля для соматических вариантов минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного распознавания варианта, составляет 450x на один набор олигонуклеотидов. Соответственно, требуется 450 фрагментов ДНК на набор олигонуклеотидов, что эквивалентно 900 перекрывающимся парным прочтениям. Число образцов и общее число анализируемых оснований влияют на покрытие. GC-состав и другие характеристики геномного состава влияют на покрытие.
 - ▶ При распознавании соматического варианта требуется фильтрация как минимум 6 повторов в референтном геноме, учитываются только повторы длиной до 3 п.о. (R3x6).
 - ▶ Модуль для соматических вариантов не позволяет различать герминальные и соматические варианты. Модуль предназначен для обнаружения вариантов в

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

диапазоне частот вариантов, но частоту вариантов нельзя использовать для дифференциации соматических и герминальных вариантов.

- Нормальные ткани в образце влияют на обнаружение вариантов. Указанный предел обнаружения основан на частоте варианта относительно общей ДНК, выделенной из опухоли и из нормальной ткани.

Компоненты продукта

- 1 Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (кат. № 20005715)
- 2 Компоненты программного обеспечения Секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, включая следующее:

Программное обеспечение	Функция	Описание
Системное программное обеспечение NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Контролирует работу прибора	Приложение NOS управляет работой прибора во время секвенирования и генерирует изображения для использования программным обеспечением анализа в реальном времени (RTA).
Программное обеспечение для анализа в режиме реального времени (RTA)	Выполняет первичный анализ	Приложение RTA преобразует изображения, сгенерированные NOS для каждого перекрытия за цикл секвенирования, в файлы распознавания оснований, которые являются вводными данными для модулей анализа для Local Run Manager. Приложение RTA не имеет пользовательского интерфейса.
Локальный менеджер прогона Local Run Manager	Интерфейс для выбора модуля	Локальный менеджер прогона Local Run Manager - это включенная в прибор программа для пользовательского управления, выбора соответствующего модуля анализа и контроля статуса.
Модуль для соматических вариантов	Выполняет вторичный анализ	Программное обеспечение модуля анализа Local Run Manager - распознает основания при вторичном анализе. Обработка данных включает в себя демультимплексирование, генерирование файла FASTQ, выравнивание, распознавание вариантов и создание отчетов. Программное обеспечение для распознавания вариантов (Pisces) генерирует файлы VCF, которые содержат информацию о вариантах, обнаруженных в конкретных позициях по отношению к референтному геному, и включают в себя измеренную частоту вариантов.
Модуль для герминальных вариантов	Выполняет вторичный анализ	Программное обеспечение модуля анализа Local Run Manager - распознает основания при вторичном анализе. Обработка данных включает в себя демультимплексирование, генерирование файла FASTQ, выравнивание, распознавание вариантов и создание отчетов. Программное обеспечение для распознавания вариантов (Pisces) генерирует файлы VCF, которые содержат информацию о вариантах, обнаруженных в конкретных позициях по отношению к референтному геному, и идентифицирует каждый вариант как гетерозиготный или гомозиготный.

Условия работы

Параметр	Спецификация
----------	--------------

Температура	Температура в лаборатории от 19 °C до 25 °C (22 °C ± 3 °C). Эта температура является рабочей температурой прибора. Во время работы не допускайте изменения температуры окружающей среды более чем на ± 2 °C.
-------------	--

Параметр	Спецификация
Влажность	Поддерживать относительную влажность в диапазоне 20-80 %, без конденсации.

Оборудование и материалы

Необходимые оборудование и материалы, поставляемые отдельно

Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)), для секвенирования нуклеиновых кислот, кат. № 20028870

Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот, кат. № 20028871

Необходимые оборудование и материалы, поставляемые отдельно

Расходные материалы для прогона, обеспечиваемые пользователем

Расходные материалы	Поставщик	Цель
Смоченные спиртом салфетки, 70 % изопропиловый спирт или Этанол, 70 %	VWR, кат. № 95041-714 (или эквивалент) Основной поставщик лаборатории	Очистка проточной ячейки и общее назначение
Лабораторные безворсовые салфетки	VWR, кат. № 21905-026 (или эквивалент)	Очистка проточной ячейки и общее назначение

Расходные материалы для эксплуатации прибора, обеспечиваемые пользователем

Расходные материалы	Поставщик	Цель
NaOCl, 5 % (натрия гипохлорит)	Sigma-Aldrich, кат. № 239305 (или эквивалент ч.д.а.)	Промывка прибора в ручном режиме после прогона после разведения до 0,12 %
Твин-20	Sigma-Aldrich, кат. № P7949	Промывка прибора в ручном режиме после разведения до 0,05 %
Вода ч.д.а.	Основной поставщик лаборатории	Промывка инструмента (ручная промывка)
Воздушный фильтр	Illumina, кат. № 20022240	Очистка воздуха, используемого для охлаждения прибора

Руководство по воде лабораторного класса чистоты

При работе с инструментом используйте только воду лабораторного класса чистоты или деионизированную воду. Не используйте водопроводную воду. Используйте только воду следующих степеней чистоты, или эквивалент:

- ▶ Деионизированная вода
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Вода 18 МОм (MQ)
- ▶ Вода Milli-Q
- ▶ Вода Super-Q
- ▶ Вода чистая для молекулярно-биологических исследований

Предупреждения и меры предосторожности

ВНИМАНИЕ

Федеральный закон США ограничивает продажу этого устройства врачом или по заказу врача или другого медицинского специалиста, имеющего лицензию в соответствии с законодательством штата, в котором он/она работает, для использования или распоряжения об использовании устройства.

- 1 Некоторые компоненты реагентов, поставляемые Illumina для использования с секвенатором нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, содержат потенциально опасные химические вещества. Их вдыхание, проглатывание, попадание на кожу и в глаза может привести к повреждениям органов. Используйте защитные средства, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат, соответствующие риску воздействия. С использованными реагентами следует обращаться как с химическими отходами и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законами и правилами. Для получения дополнительной информации по вопросам окружающей среды, здоровья и безопасности см. паспорт безопасности вещества (Safety data sheets, SDS) по адресу support.illumina.com/sds.html.
- 2 О любых серьезных инцидентах, связанных с данным продуктом, следует незамедлительно сообщать в компанию «Иллюмина» (Illumina) и в компетентные органы государства-члена, в котором находятся пользователь и/или пациент.
- 3 Со всеми образцами крови следует работать как с потенциально инфекционными материалами в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита В (ВГВ) и других возбудителей, передающихся через кровь (универсальные меры предосторожности).
- 4 Невыполнение описанных процедур может привести к ошибочным результатам или значительному снижению качества образца.
- 5 Следует применять стандартные меры лабораторной безопасности. Не пипетируйте ртом. Не ешьте, не пейте и не курите в предназначенных для работы зонах. При работе с образцами и реагентами набора следует использовать одноразовые перчатки и лабораторные халаты. После работы с образцами и реагентами набора следует тщательно помыть руки.
- 6 Для предотвращения контаминации продуктами ПЦР реагентов, инструментов и образцов геномной ДНК необходимо соблюдать нормы надлежащей лабораторной практики и надлежащей лабораторной гигиены. Контаминация при проведении ПЦР может привести к неточным и ненадежным результатам.
- 7 Для предотвращения контаминации убедитесь, что в зонах для пре- и постамплификации имеется специальное оборудование (в т.ч. пипетки, наконечники для пипеток, вортекс и центрифуга).
- 8 Пара индекс-образец должна точно соответствовать распечатанной схеме планшета. Локальный менеджер прогона автоматически вносит информацию об индексированных праймерах, связанных с названиями образцов, когда названия вводятся в модуль. Пользователю рекомендуется перед началом прогона проверить индексированные праймеры, связанные с образцами. Несовпадение между списком образцов и схемой планшета приводит к потере правильной идентификации образца и неправильному сообщению результатов.
- 9 Для защиты компьютера от вирусов пользователю настоятельно рекомендуется установить антивирусное программное обеспечение. Инструкции по установке см. в руководстве для пользователя.
- 10 Не используйте секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx при снятых панелях. При эксплуатации прибора с любой из снятых панелей возникает возможность поражения электрическим током.
- 11 Не касайтесь держателя проточной ячейки в отделении проточной ячейки. Рабочая температура нагревателя в этом отделении составляет от 22 до 95 °C и может вызвать ожог.
- 12 Масса прибора составляет около 186 фунтов, что может привести к серьезным травмам при его падении или неправильном обращении с прибором.

Инструкция по применению

Следующие инструкции по применению предназначены для прогонов с модулями для герминальных и соматических вариантов в режиме диагностики на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) (не применимо для Российской Федерации), набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот.

Внесение информации о прогоне

Для получения подробных инструкций см. Руководство справочное для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (документ № 1000000009513) и соответствующее руководство для модуля Local Run Manager.

Установка параметров

- 1 Войдите в Local Run Manager.
- 2 Выберите **Create Run**, затем выберите **Somatic Variant** или **Germline Variant**.
- 3 Введите название прогона, которое идентифицирует прогон от этапа секвенирования до этапа анализа. Используйте буквенно-цифровые символы, пробелы, подчеркивания или дефисы.
- 4 **[Не обязательно]** Введите описание прогона для облегчения его идентификации. Используйте буквенно-цифровые символы, пробелы, подчеркивания или дефисы.
- 5 В раскрывающемся списке выберите число образцов и набор индексов. При выборе учитывайте следующую информацию.
 - ▶ Раскрывающийся список включает в себя число образцов и набор индексов. Например, 24-Set 1 означает анализ 24 образцов с индексами из набора индексов 1.
 - ▶ Номера наборов индексов указывают на различные наборы пар индексов i5 и i7. Оба набора, 1 и 2, обеспечивают разнообразие индексов. Два набора индексов включены для того, чтобы предотвратить истощение одного набора.
 - ▶ Выберите ближайшее к числу анализируемых вами число образцов. Если в списке нет именно этого числа образцов, выберите ближайшее число, меньшее числа анализируемых вами образцов. Например, при анализе 18 образцов выберите 16 образцов.
 - ▶ Предлагаемые лунки для образцов и комбинации индексов, которые удовлетворяют требованиям разнообразия индексов, выделены зеленым цветом.

Импортируйте манифест-файл для прогона

- 1 Убедитесь, что манифест-файлы, которые вы хотите импортировать, находятся в доступном сетевом окружении или на USB-диске.
- 2 Выберите **Import Manifests**.
- 3 Перейдите к манифест-файлу и выберите те, которые вы хотите добавить.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для доступности манифест-файлов для всех прогонов с использованием модуля для герминальных или соматических вариантов добавьте их с помощью функции **Module Settings**. Эта функция требует прав администратора. Дополнительную информацию см. в Руководстве справочном для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (документ № 1000000009513)

Укажите образцы для прогона

Укажите образцы для прогона одним из следующих способов с последующими инструкциями.

- ▶ Введите информацию об образцах в ручном режиме - используйте пустую таблицу на экране **Create Run**.

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

- ▶ Импортируйте информацию об образцах - перейдите к внешнему файлу в формате значений, разделенных запятыми (*.csv). На экране Create Run есть шаблон для загрузки.

Введение информации об образцах в ручном режиме

- 1 Введите уникальное название образца (*модуль анализа для соматических вариантов*) или идентификационный код образца (*модуль анализа для герминальных вариантов*).
Используйте буквенно-цифровые символы, дефисы или подчеркивания.
- 2 [Необязательно] Для положительных или отрицательных контрольных образцов нажмите на правую кнопку мыши и выберите тип контроля.
Контроль в одной лунке будет автоматически внесен в соответствующую лунку того же контроля для другого пула.
- 3 [Необязательно] Введите описание образца в поле Sample Description. Используйте буквенно-цифровые символы, дефисы или подчеркивания.
- 4 В раскрывающемся списке Index 1 (i7) выберите Index 1 adapter.
Если вы используете предложенные лунки для образцов, программное обеспечение автоматически заполняет индексированные адаптеры i7 и i5, которые соответствуют требованиям разнообразия индексов. Если в списке нет числа образцов, которые вы анализируете, выберите индексированные адаптеры для дополнительных лунок.
- 5 В раскрывающемся списке Index 2 (i5) выберите Index 2 adapter.
- 6 В раскрывающемся списке Manifest выберите манифестный файл.
Для образцов в пуле A требуется манифест, отличный от манифеста для образцов в пуле B.
- 7 Выберите опции просмотра, печати или сохранения схемы планшета в качестве справочного материала при подготовке библиотек:
 - Выберите значок  Print для отображения схемы планшета. Выберите Print для печати схемы планшета.
 - Выберите Export для экспорта информации об образцах во внешний файл.
- 8 Выберите Save Run.

Импортирование образцов

- 1 Выберите Import Samples и перейдите к файлу с информацией об образцах. Возможен импорт двух типов файлов.
 - Для создания новой схемы планшета выберите Template на экране Create Run. Файл шаблона содержит правильные заголовки столбцов для импорта. Введите информацию об образцах в прогоне в каждый столбец. Удалите включенную для примера информации в неиспользуемых ячейках, а затем сохраните файл.
 - Используйте файл с информацией об образцах, который был экспортирован из модуля для герминальных или соматических вариантов с использованием функции экспорта.
- 2 Выберите значок  Print для отображения схемы планшета.
- 3 Выберите Print для печати схемы планшета в качестве референтной для приготовления библиотек.
- 4 Выберите Save Run.

Подготовьте картридж с реагентами

Для успешного секвенирования тщательно следуйте указаниям для картриджа с реагентами.

- 1 Возьмите картридж с реагентами из морозильника при температуре от -25 °C до -15 °C.

- Для размораживания реагентов выберите один из следующих методов: Не затопляйте картридж. После размораживания картриджа высушите его, прежде чем переходить к следующему этапу.

Температура	Время размораживания	Предел стабильности
от 15 °C до 30 °C на водяной бане	60 минут	Не более 6 часов
от 2 °C до 8 °C	7 часов	Не более 5 дней

ПРИМЕЧАНИЕ

Если на одной водяной бане размораживают более одного картриджа, следует предусмотреть дополнительное время для размораживания.

- Переверните картридж 5 раз для перемешивания реагентов.
- Осмотрите дно картриджа, чтобы убедиться, что реагенты разморожены и в них нет осадка. Убедитесь, что позиции 29, 30, 31 и 32 разморожены, поскольку они самые большие и оттаивают дольше всего.
- Осторожно постучите по поверхности рабочего стола для удаления пузырьков воздуха. Для достижения наилучших результатов сразу же перейдите к внесению образца и запуску прогона.

Подготовка проточной ячейки

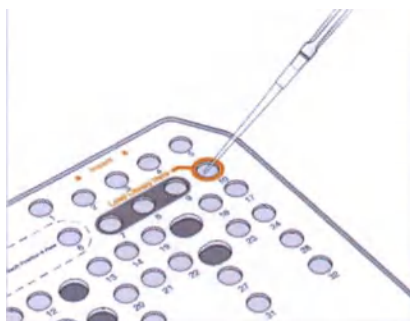
- Возьмите новую проточную ячейку, хранящуюся при температуре от 2 °C до 8 °C.
- Извлеките упаковку из коробки и оставьте при комнатной температуре на 30 минут.

Подготовка библиотек к секвенированию

Денатурируйте и разбавьте библиотеки до вносимого объема 1,3 мл. На практике вносимая концентрация может варьироваться в зависимости от приготовления библиотеки и методов количественной оценки. Разведение библиотек образцов зависит от комплексности наборов олигонуклеотидов. Инструкции по приготовлению библиотек образцов для секвенирования, включая разведение и объединение библиотек, см. в разделе Инструкции по применению соответствующего набора для приготовления библиотек. При работе с Секвенатором нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx требуется оптимизация плотности кластеров.

Внесение библиотеки на картридж с реагентами

- Очистите пленку из фольги, покрывающую резервуар № 10 с надписью Load Library Here, безворсовой салфеткой.
- Проколите пленку чистым 1 мл наконечником.
- Внесите 1,3 мл подготовленных библиотек в резервуар № 10, помеченный как Load Library Here. Избегайте прикосновения к фольге при внесении библиотек.

Рисунок 1 Внесение библиотек**Подготовка к прогону секвенирования**

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

- 1 Войдите в систему секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, используя ваш пароль для Local Run Manager.
- 2 В главном окне программного обеспечения NOS выберите Sequence.
- 3 Выберите прогон из списка, затем выберите Next.
Появится ряд окон настройки запуска в следующем порядке: Load Flow Cell, Load Buffer Cartridge, Load Reagent Cartridge и Pre-run Check.
- 4 При появлении окна Load Flow Cell очистите и затем установите проточную ячейку.
 - ▶ Извлеките проточную ячейку из пленочной упаковки.
 - ▶ Вскройте прозрачную пластиковую упаковку и извлеките проточную ячейку.
 - ▶ Очистите стеклянную поверхность проточной ячейки смоченной спиртом безворсовой салфеткой. Высушите стекло лабораторной безворсовой салфеткой.
 - ▶ Убедитесь, что стеклянная поверхность проточной ячейки чистая. При необходимости повторите этап очистки.
 - ▶ Удалите использованную проточную ячейку предыдущего прогона.
 - ▶ Совместите проточную ячейку с направляющими и установите проточную ячейку в держатель.
- 5 Выберите Load.
Дверца автоматически закрывается, на экране появляется идентификатор проточной ячейки, проверяются датчики.
- 6 Следуйте указаниям программного обеспечения: опорожните контейнер с отработанными реагентами, установите картридж с буфером NextSeq 550Dx и установите картридж с реагентами NextSeq 550Dx.
Когда картриджи с буфером и реагентами NextSeq 550Dx установлены, программное обеспечение считывает и записывает сигналы радиочастотной идентификации (RFID). На экране появляются идентификаторы картриджей буфера и реагентов, проверяются датчики.
- 7 После завершения автоматической предварительной проверки выберите Start. (Не требуется, если выбрана конфигурация автоматического запуска.)
- 8 При начале прогона открывается экран Sequencing. На этом экране представлена визуальная информация о выполняемом прогоне, включая показатели интенсивности и качества (Q-показатели).

Результаты

Программное обеспечение анализа в реальном времени (RTA) выполняет анализ изображений и распознавание нуклеотидов и присваивает каждому основанию при каждом цикле секвенирования показатель качества. После завершения первичного анализа выбранный модуль Local Run Manager секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx автоматически начинает вторичный анализ. Здесь описаны процессы вторичного анализа модулей для герминальных и соматических вариантов.

Демультимплексирование

При демультимплексировании каждая последовательность прочтения индекса сравнивается с последовательностями индекса, указанными для прогона. На этом этапе показатели качества не учитываются.

Индексные прочтения выявляются при следующих действиях:

- ▶ Образцы нумеруются, начиная с 1, в соответствии с порядком, в котором они перечислены в прогоне.
- ▶ Образец номер 0 зарезервирован для кластеров, которые не были назначены для образца.
- ▶ Кластеры присваиваются образцу, когда индексная последовательность полностью совпадает или, когда имеется одно различие на прочтение индекса.

Генерирование файла FASTQ

После демультиплексирования программное обеспечение генерирует промежуточные файлы анализа в формате FASTQ, который представляет собой текстовый формат, используемый для представления последовательностей. Файлы FASTQ содержат прочтения для каждого образца и соответствующие показатели качества. Кластеры, не прошедшие фильтрацию, исключаются.

Каждый файл FASTQ содержит прочтения только для одного образца, а название этого образца включено в имя файла FASTQ. В модулях для герминальных и соматических вариантов для каждого образца генерируется восемь файлов FASTQ для каждого набора олигонуклеотидов, четыре из прочтения 1 и четыре из прочтения 2. В результате всего получается 8 и 16 файлов FASTQ на образец для модулей для герминальных и соматических вариантов, соответственно. Основными файлами с вводимыми данными для выравнивания являются файлы FASTQ.

Выравнивание

На этапе выравнивания алгоритм Смита-Уотермана для полос выравнивает кластеры из каждого образца с последовательностями ампликонов, указанных в манифестном файле.

Алгоритм Смита-Уотермана для полос выполняет полуглобальное выравнивание последовательностей для определения сходных областей у двух последовательностей. Вместо сравнения всей последовательности алгоритм Смита-Уотермана сравнивает сегменты всех возможных длин.

Каждое парное прочтение оценивается в отношении его выравнивания с последовательностями соответствующих зондов для этого прочтения.

- ▶ Прочтение 1 оценивается по отношению к обратнo-комплементарным последовательностям нижерасположенных локус-специфичных олигонуклеотидов (DLSO).
- ▶ Прочтение 2 оценивается по отношению к последовательностям вышерасположенных локус-специфичных олигонуклеотидов (ULSO).
- ▶ Если начало прочтения соответствует последовательности зонда с не более чем одним различием, то полная длина прочтения этой последовательности выравнивается относительно целевого ампликона.
- ▶ Если начало прочтения соответствует последовательности зонда с не более чем тремя различиями (несовпадения или сдвиги из-за предшествующих инделов), то полная длина прочтения этой последовательности выравнивается относительно целевого ампликона.
- ▶ Учитывая химию анализа, инделы в DLSO и ULSO не наблюдаются.

Выравнивания фильтруются по результатам выравнивания на основе коэффициентов несоответствия в области интереса или по всему ампликону, в зависимости от длины ампликона. Отфильтрованные выравнивания записываются в файлы выравнивания как невыровненные и не используются при распознавании варианта.

Распознавание вариантов

Программа Pisces предназначена для определения вариантов с SNV и инделами в библиотеках, приготовленных для прибора.

Отчеты и дополнительные файлы результатов

Модули анализа вариантов создают отчеты в формате PDF и с разделителями табуляцией (*.txt), в которых отображены такие параметры, как глубина секвенирования и число вариантов. Модули также генерируют файлы результатов, такие как VCF и геномные файлы Variant Call Format (gVCF), для приложений, определяющих варианты.

Процедуры контроля качества

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

Программное обеспечение Секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx оценивает каждый прогон, образец и распознавание оснований по показателям контроля качества. При подготовке библиотек рекомендуется включать положительные и отрицательные контроли, они также должны быть оценены. Оценивайте контроли следующим образом:

- Отрицательный контроль (контроль без матрицы) или другой отрицательный контроль - должен приводить к ожидаемому результату. Если результат отрицательного контроля отличается от ожидаемого, то произошла ошибка в отслеживании образца, неправильная запись индексированных праймеров или контаминация.
- Положительный контроль - должен приводить к ожидаемому результату. Если результат положительного контроля отличается от ожидаемого, то произошла ошибка в отслеживании образца или неправильная запись индексированных праймеров.

Рабочие характеристики

Рабочие характеристики Секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx установлены для модулей для герминальных и соматических вариантов с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот и подтверждены с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот. Исследовали индексирование образцов, перенос анализируемого материала из одного образца в другой при проведении анализа, количество вносимой ДНК, аналитическую чувствительность (предел холостого образца/предел обнаружения), точность, прецизионность, сравнение методов и воспроизводимость.

Аналитические исследования с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) были разработаны для оценки заявленных рабочих характеристик, ранее установленных при использовании ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). Результаты показывают, что рабочие характеристики наборов реагентов (v2 и v2.5) сопоставимы с набором реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx. Рабочие характеристики, связанные с преаналитическими факторами, такими как методы выделения ДНК и присутствие посторонних веществ см. в инструкции по применению набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения.

Определения, используемые при расчетах рабочих характеристик

- 1 Процент согласованности положительных результатов (positive percent agreement - PPA) рассчитывается как доля локусов, классифицированных референтным методом как варианты, правильно выявленных при анализе.
 - ▶ (число вариантных локусов, правильно выявленных при анализе)/(общее число вариантных локусов)
 - Вариантные локусы, выявленные при анализе и соответствующие выявленным референтным методом, являются истинно положительными (TP). Вариантные локусы, выявленные при анализе как референтные или как другие варианты, являются ложноотрицательными (FN).
- 2 Процент согласованности отрицательных результатов (negative percent agreement - NPA) рассчитывается как доля локусов, классифицированных референтным методом как локусы дикого типа, правильно выявленных при анализе.
 - ▶ (число локусов дикого типа, правильно выявленных при анализе)/(общее число локусов дикого типа)
 - Локусы дикого типа, выявленные при анализе и соответствующие выявленным референтным методом, являются истинно отрицательными (TN). Локусы дикого

типа, квалифицированные при анализе как варианты, являются ложноположительными (FP).

- 3 Процент общей согласованности (overall percent agreement - OPA) рассчитывается как доля локусов, правильно выявленных при анализе относительно референтного метода.
 - $$\frac{((\text{число вариантов локусов, правильно выявленных при анализе}) + (\text{число локусов дикого типа, правильно выявленных при анализе}))}{((\text{общее число вариантов локусов}) + (\text{общее число локусов дикого типа}))}$$
- 4 Расчеты PPA, NPA и OPA не включают в себя нераспознанные основания (вариантные или референтные локусы, не соответствующие одному или нескольким фильтрам качества).
- 5 Уровень распознавания аутосомных вариантов рассчитывается как общее число локусов, пропущенных фильтром, деленное на общее число позиций, секвенированных для хромосом 1-22; хромосомы X и Y исключены. Этот показатель не учитывает согласованности распознавания с референтным методом.

Рабочие характеристики набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот

Индексирование образцов

Индексированные праймеры образца, внесенные во время приготовления библиотек, придают каждому образцу ДНК уникальную последовательность. Эти уникальные последовательности позволяют объединять несколько образцов в одном прогоне секвенирования. Индексация образцов используется в протоколах и для герминальных, и для соматических вариантов. Целью данного исследования было установить минимальное (8) и максимальное (96) число образцов, которые могут быть обработаны за один прогон секвенирования на Секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Тестировали 8 уникальных образцов проекта Platinum Genome с использованием 12 различных комбинаций, индексированных праймеров на образец. Результаты образца из четырех прогонов секвенирования с использованием модуля для герминальных вариантов сравнивали с данными Platinum Genomes версии 2016-1.0.

В первой серии прогонов 96 библиотек образцов с уникальной индексацией тестировали репрезентативным методом, направленным на множество генов с охватом 12 588 оснований на цепь во всех 23 хромосомах человека, чтобы проверить способность анализа проводить согласованное генотипирование данного образца при различных комбинациях, индексированных праймеров. Во второй серии прогонов 8 библиотек образцов с уникальной индексацией секвенировали в двух прогонах секвенирования для проверки минимального числа поддерживаемых индексов.

Для прогонов с 96 индексами PPA для SNV составляла от 98,7% до 100%, PPA для инсерций и делеций - 100%, а NPA - 100% для каждой из 96 комбинаций индексов. Для прогонов с 8 индексами PPA составляла 100% (SNV, вставки и делеции) и NPA - 100% для каждой из восьми комбинаций индексов.

Перенос анализируемого материала из одного образца в другой при анализе в приборе

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет секвенировать нескольких образцов и контролей в одном прогоне секвенирования. Для оценки степени переноса образца при одном прогоне (внутри прогона) и между прогонами секвенирования (прогон-прогон, между прогонами) было проведено исследование. В репрезентативном анализе тестировали два образца из проекта Platinum Genome, один, полученный от мужчины, и один - от женщины. Анализ был направлен на множество генов с охватом 12 588

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах, включая обе половые хромосомы. Библиотеки секвенировали с помощью Секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, используя модуль для герминальных вариантов. Перенос образцов от мужчины в образцы от женщины оценивали по наличию прочтений ампликона Y-хромосомы в образцах от женщины.

Перенос внутри прогона может возникать при генерировании кластера, распознавании оснований при считывании индекса и демультимплексировании образца. Для тестирования переноса образцов внутри прогона на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx провели одно секвенирование пула библиотек, состоящего из 46 повторностей образцов от мужчины и женщины и четырех контролей без матрицы. Перенос внутри прогона оценивали путем сравнения покрытия ампликона Y-хромосомы в повторностях образца от женщины со средним покрытием ампликона Y-хромосомы всех повторностей образца от мужчины в пуле. Медиана наблюдаемого переноса внутри прогона составила 0,084%.

Для тестирования переноса образца между прогонами приготовили два пула библиотек, которые последовательно секвенировали на одном секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Первый пул содержал 46 повторностей образца от женщины и два контроля без матрицы. Второй пул содержал 46 повторностей образца от мужчины и два контроля без матрицы. Для обоих пулов использовали один и тот же индексированный адаптер. Сначала проводили прогон секвенирования пула от женщины, затем - от мужчины, затем - снова от женщины. Перенос между прогонами оценивали путем сравнения покрытия ампликона Y-хромосомы в соответствующих повторностях второго прогона пула от женщины и прогона пула от мужчины. Медиана наблюдаемого переноса между прогонами составила 0,0076%.

Количество вносимой ДНК

Кровь (герминальные варианты)

Для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx был установлен диапазон уровня вносимой ДНК крови при приготовлении библиотек с помощью набора реагентов создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx при использовании протокола для герминальных вариантов. Диапазон оценивали в исследовании серийных разведений 13 образцов из проекта Platinum Genome при репрезентативном анализе, направленном на множество генов с охватом 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. Библиотеку секвенировали на двух секвенаторах нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием одной партии набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)).

Пять образцов тестировали в двух повторностях при пяти вариантах вносимой ДНК в диапазоне от 250 до 12 нг (250 нг, 100 нг, 50 нг, 25 нг и 12 нг). Восемь образцов тестировали в одной повторности при пяти вариантах вносимой ДНК. Для определения точности генотипы образцов сравнивали с данными в Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Результаты определяли для каждого варианта вносимой ДНК. РРА для каждого типа вариантов (SNV, инсерции и делеции) приведены в таблице 1; NPA приведены в таблице 2. Точность при всех уровнях ДНК была одинаковой. Рекомендуемое количество ДНК для набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx составляет 50 нг, 25 нг и 100 нг - это соответственно нижний и верхний пределы внесения, обеспечивающие соответствие заявленным рабочим характеристикам.

Таблица 1. Результаты РРА для каждого варианта вносимой ДНК по типу вариантов

Вносимое количество ДНК (нг)	Тип варианта	Ожидаемые варианты	TP	FN	Нераспознанные варианты	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Инсерция	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Делеция	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Таблица 2. NPA для каждого варианта вносимой ДНК

Вносимое количество ДНК (нг)	TN	FP	Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Соматические варианты)

Для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx был установлен диапазон количества вносимой ДНК из фиксированных формалином, залитых в парафин образцов (FFPE) при приготовлении библиотек с помощью набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения при использовании протокола для соматических вариантов. Диапазон оценивали в исследовании серийных разведений трех образцов из проекта Platinum Genome при репрезентативном анализе, направленном на множество генов с охватом 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. Культуры клеток проекта Platinum Genome GM12878 and GM12877 фиксировали формалином и заливали в парафин, после чего выделяли ДНК. Образец GM12878 разводили образцом GM12877 так, чтобы аллельные частоты вариантов (VAF) 81 варианта (55 SNV, 10 инсерций и 16 делеций) составляли

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

около 0,025, 0,05 или 0,10. Кроме того, каждый образец содержал 91 вариант с более высокими частотами вариантов, до 1,0 VAF. Образцы обрабатывали в двух повторностях при пяти вариантах вносимого количества ДНК со средней разницей числа циклов (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 и 7,8, как измерено с помощью набора реагентов для оценки качества геномной ДНК, выделенной из образцов тканей, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки TruSeq™ Custom Amplicon Dx FFPE QC Kit. Каждую библиотеку секвенировали на двух секвенаторах нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием двух партий набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). Для определения точности, генотипы образцов сравнивали с Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Значения PPA для каждого варианта (SNV, инсерции и делеции) приведены в таблице 3, значения NPA приведены в таблице 4. Рекомендуемое количество вносимой ДНК для вариантов с 0,05 VAF или выше - $dCq \leq 4$, значение 4,6 является нижним пределом для соответствия рабочим характеристикам.

Таблица 3. Результаты PPA для каждого количества вносимой ДНК по типу вариантов

Среднее значение dCq	Тип варианта	Ожидаемые варианты	Ожидаемое значение нераспознанных вариантов	Целевое разведение VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Нераспознанные варианты	PPA (%)	Нераспознанные варианты	PPA (%)	Нераспознанные варианты	PPA (%)
2,1	SNV	808	Неприменимо.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Инсерция	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Делеция	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Таблица 4. NPA для каждого количества вносимой ДНК

Среднее значение dCq	Ожидаемый дикий тип	Целевое разведение VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)	Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)	Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	> 99,9	3296	> 99,9	2996	100
7,8		3020	> 99,9	2880	> 99,9	2448	> 99,9

Аналитическая чувствительность (уровень фона [предел холостой пробы, LoB] и предел обнаружения [LoD])

Настоящее исследование было проведено для оценки уровня фона (предела холостой пробы, LoB) и предела обнаружения (LoD) модуля для соматических вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Исследование проводили с помощью репрезентативного анализа, направленного на множество генов с охватом 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. Культуры клеток проекта Platinum Genome GM12878 и GM12877 фиксировали формалином и заливали в парафин, после чего выделяли ДНК. Образец GM12878 разводили образцом GM12877 так, чтобы частоты вариантных аллелей 74 вариантов (53 SNV, 7 вставок и 14 делеций) составляли $0,05 \pm 0,02$. Прогоны секвенирования GM12877 и разведения GM12878 (GM12878-D) начинали в шесть последовательных дней на одном приборе, чередуя две партии набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)), всего шесть прогонов секвенирования. В результате этого анализа для каждой партии реагентов получено по 60 повторностей для каждого варианта в GM12878-D и по 72 повторности для каждой соответствующей координаты дикого типа в GM12877. LoB и LoD рассчитывали, используя классический подход, как описано в CLSI EP17-A2, используя непараметрический метод. LoB и LoD рассчитывали для SNV, инсерций и делеций по отдельности путем объединения частот вариантов данного типа. Ошибку типа I определили, как 0,01, а ошибку типа II - как 0,05.

При расчете LoB объединенные частоты вариантов были отсортированы от наименьшего к наибольшему, и была рассчитана позиция 99-го ранга для каждой партии реагентов для каждого типа вариантов (таблица 5). Модуль для соматических вариантов использует отсечку (эффективный LoB) 0,026 VAF для определения качественного обнаружения вариантов. Результаты расчета LoB подтвердили, что эта отсечка приводит к ошибке типа I не более 0,01.

Таблица 5. Предел холостого образца (LoB)

Тип варианта	Всего наблюдений	LoB - партия реагентов 1 (%)	LoB - партия реагентов 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Вставка	504	0,56	0,56
Делеция	1008	1,20	1,20

Для LoD был рассчитан процент частоты индивидуальных мутаций для каждой партии реагентов для каждого типа вариантов ниже отсечки 0,026 (таблица 6). Поскольку

проценты были меньше, чем ошибка типа II, равная 5% (0,05), LoD рассчитывали, как медиану объединенных частот вариантов (таблица 6). Для каждого типа вариантов за LoD было принято наибольшее из двух значений, рассчитанных для двух партий реагентов: 4,97% для SNV, 5,12% для инсерций и 5,26% для делеций.

Таблица 6. Предел обнаружения (LoD)

Партия реагентов	Тип варианта	Всего наблюдений	№ измерений VAF < 2,6 %	% измерений VAF < 2,6 %	Предел определения (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Инсерция	420	6	1,4	5,08
	Делеция	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Инсерция	420	5	1,2	5,12
	Делеция	840	7	0,80	5,26

Точность**Герминальные варианты**

Для оценки точности распознавания вариантов было проведено следующее исследование с использованием модуля для герминальных вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). В репрезентативном анализе, направленном на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах, тестировали 13 уникальных образцов из проекта Platinum Genome. Всего было выполнено девять прогонов с использованием трех приборов для секвенирования, трех партий реагентов тремя операторами в течение пяти первых дней. Точность в отношении SNV, инсерций и делеций определяли путем сравнения результатов с хорошо охарактеризованным композиционным референтным методом, Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Надежно установленные области определяли на основании этого референтного метода, если не указано иное.

Таблица 7. Герминальные варианты - сводные результаты по согласованности

Критерии	Всего наблюдений ¹	Результат по наблюдениям ²	Результат по прогонам ³
PPA для SNV	819	98,7	> 99,9
PPA для вставок	819	95,0	98,9
PPA для делеций	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Рассчитывается как число образцов на прогон (91) x число прогонов (9) = 819.

²Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца в 9 прогонах.

³Наименьшее значение при анализе данных всех прогонов в совокупности.

В таблице 8 приведены данные исследования с процентом согласованности положительных и отрицательных результатов для каждого образца, результаты вариантов сравнены с данными Platinum Genomes, версия 2016-1.0, для расчетов PPA. Три типа вариантов (SNV, инсерции и делеции) объединены. Поскольку референтный метод предоставляет результаты только для вариантов с заменами и инсерциями/делециями одного нуклеотида, для расчетов NPA результаты невариантных оснований сравнивали с референтной последовательностью генома человека hg19.

Таблица 8. Герминальные варианты - согласованность для образца

Образец	Средний уровень распознавания	Ожидаемые варианты ¹	TP	FN	Нераспознанные варианты	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹ Суммарное число вариантов во всех повторностях образцов в 9 прогонах.

В таблице 9 приведены данные исследования по образцам, результаты для вариантов сравнены с результатами хорошо охарактеризованного референтного композитного метода. Для каждого типа вариантов - SNV, инсерции и делеции - выявление оценивается отдельно. Референтные позиции исключены.

Таблица 9. Герминальные варианты - согласованность для образца по типу варианта

>Образец	SNV			Инсерции			Делеции		
	>Ожидаемое значение	> TP	> FN	>Ожидаемое значение	> TP	> FN	Ожидаемое значение	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Образцы также анализировали в отношении распознавания небольших инсерций и делеций (инделов). Сводные результаты приведены в таблице 10. Число инделов в общей сложности составило 71, их длина варьировалась от 1 до 24 п.о. для инсерций и от 1 до 25 п.о. для делеций.

Таблица 10. Сводные данные определения инделов герминальных вариантов

Тип варианта	Ожидаемые варианты	TP	FN	Нераспознанные варианты	PPA
Инсерция	18522	18018	27	477	99,9
Делеция	17388	17073	0	315	100

Репрезентативный анализ включал в себя 150 ампликонов, покрывающих области с различным геномным составом. GC-состав ампликонов варьировался в диапазоне 0,19-0,87. Ампликоны содержали повторы одного нуклеотида (т.е. поли(А), поли(Т)...), динуклеотидов и тринуклеотидов. Данные компилировали для каждого ампликона (таблица 11), чтобы определить влияние геномного состава на процент правильных распознаваний. Процент правильных распознаваний включает в себя распознанные и референтные варианты и составляет менее 100 % при наличии неправильных распознаваний или нераспознанных вариантов.

Таблица 11. Герминальные варианты - точность на уровне ампликона

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли А (5), Поли С (5), индел	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли Т (10), индел	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли А (5), СТ(3), ТАА (3), индел	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли А (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли Т (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли Т (5), индел	0,31	71253	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли Т (5), Поли А (6), индел	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Индел	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли Т (5), индел	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли А (5), Поли Т (5), Поли А (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли А (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли G (6), Поли Т (5), Поли А (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли А (5), индел	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли А (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли А (7), индел	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	61425	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли А (6), индел	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли Т (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	СТ(5), индел	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли Т (5), ТСТ(3), СТТ (3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли С (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли G (5), индел	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли А (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли А (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли G (5), индел	0,62	73710	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли G (6), Поли C (6), индел	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли G (7), CTC(4), индел	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли C (6), индел	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли G (5), индел	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Поли T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли A (5), Поли T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	78624	0	0	100

Май 2022 г.

Документ № 1000000030326 в.06 | 2

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли А (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли А (5), CA(3), индел	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли С (5), индел	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли А (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли А (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли А (5), Поли Т (7), Поли А (7), индел	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	67977	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли Т (5), индел	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли А (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли С (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли G (5), индел	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли Т (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли С (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли С (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли Т (5), индел	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли С (5), индел	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли Т (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли А (13), индел (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли А (5)	0,34	74529	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли А (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), индел	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли Т (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли А (5), индел	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТ(3), индел	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли G (6)	0,73	72072	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли Т (6), СА(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли А (6), AG(3), индел	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли Т (5), Поли А (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли Т (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли С (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли А (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Результаты секвенирования образца NA12878 сравнивали с надежно установленным Национальным институтом стандартов и технологий (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (v.2.19) генотипом NA12878. Из 150 ампликонов 92 ампликона полностью лежали в надежно установленных областях генома, 41 ампликон частично перекрывался с ними, а 17 ампликонов не перекрывались с последовательностью NIST. Это привело к 10000 координат на повторность для сравнения. Невариантные распознавания сравнивали с эталонной последовательностью генома человека, сборкой hg19. Результаты в отношении точности представлены в таблице 12.

Таблица 12. Согласованность герминальных вариантов в образце NA12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средний уровень распознавания	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

На основании данных этого исследования герминальных вариантов в 9 прогонах, секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет получать согласованные данные секвенирования при следующем составе:

- ▶ GC-состав ≥ 19 % (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах с GC-составом в 19 % распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,6 %)
- ▶ GC-состав ≤ 87 % (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах с GC-составом в 87 % распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Поли-А длиной ≤ 9 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-А длиной 9, оснований распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Поли-Т длиной ≤ 10 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Т длиной 10 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Поли-Г длиной ≤ 7 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Г длиной 7 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 1,0 %)
- ▶ Поли-С длиной ≤ 6 (все распознанные основания в 2457 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-С длиной 6 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Повторы динуклеотидов длиной $\leq 11x$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы динуклеотидов длиной 11x, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,5 %)
- ▶ Повторы тринуклеотидов длиной $\leq 5x$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы тринуклеотидов длиной 5x, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,5 %)
- ▶ Вставки длиной ≤ 24 (66343 из 66370 распознанных оснований в 819 секвенированных ампликонах, содержащих инсерции длиной 24 основания, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 1,2 %, неправильных распознаваний в областях, содержащих вставки длиной 24 нуклеотида, не было)
- ▶ Делеции длиной ≤ 25 (все распознанные основания в 2457 секвенированных ампликонах, содержащих делеции длиной 25 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)

Соматические варианты

Описываемое исследование было проведено для установления точности распознавания вариантов модулем для соматических вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)).

В этом исследовании использовали репрезентативный метод, направленный на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах. ДНК выделяли из образцов FFPE проекта Platinum Genome с получением шести уникальных образцов для оценки в исследовании.

Образец ДНК GM12877 разводили образцом ДНК GM12878 для получения GM12877-D5 и GM12877-D7 как набора уникальных гетерозиготных вариантов с вариантами частот около 5% и 7%. Образец ДНК GM12878 аналогичным образом разводили образцом ДНК GM12877 для получения GM12878-D5 и GM12878-D7. Каждый из образцов тестировали в трех повторностях, за исключением разведенных образцов, которые тестировали в шести повторностях. Всего было выполнено девять прогонов с использованием трех приборов для секвенирования, трех партий реагентов тремя операторами в течение пяти первых дней. Точность в отношении SNV, инсерций и делеций определяли путем сравнения результатов с хорошо охарактеризованным композиционным референтным методом, Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Надежно установленные области определяли на основании этого референтного метода, если не указано иное.

Таблица 13. Соматические варианты - сводные данные по согласованности

Критерии	Всего наблюдений ¹	Результат по наблюдениям ²	Результат по прогонам ³
PPA для SNV	378	98,9	99,9
PPA для инсерций	378	96,9	99,9
PPA для делеций	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Рассчитывается как число образцов на прогон (42) x число прогонов (9) = 378.

²Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца в 9 прогонах.

³Наименьшее значение при анализе данных всех прогонов в совокупности.

В таблице 14 приведены данные исследования в отношении процентной согласованности положительных и отрицательных результатов по образцам, результаты для вариантов сравнены с результатами хорошо охарактеризованного референтного метода. Три типа вариантов (SNV, инсерции и делеции) объединены. Поскольку референтный метод предоставляет результаты только для вариантов с заменами и инсерциями/делециями одного нуклеотида, для расчетов NPA результаты невариантных оснований сравнивали с референтной последовательностью генома человека hg19.

Таблица 14. Соматические варианты - согласованность для образца

Образец	Средний уровень распознавания	Ожидаемое значение	TP	FN	Нераспознанные варианты	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100

Образец	Средний уровень распознавания	Ожидаемое значение	TP	FN	Нераспознанные варианты	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

В таблице 15 приведены данные исследования по образцам, результаты для вариантов сравнены с результатами хорошо охарактеризованного референтного метода. Для каждого типа вариантов - SNV, инсерции и делеции - выявление оценивается отдельно. Референтные позиции исключены.

Таблица 15. Соматические варианты - согласованность для образца по типам вариантов

Образец	SNV			Инсерции			Делеции		
	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Десять образцов далее анализировали в отношении распознавания небольших инсерций и делеций (инделов) (таблица 16). Число инделов в общей сложности составило 71, их длина варьировалась от 1 до 24 п.о. для инсерций и от 1 до 25 п.о. для делеций.

Таблица 16. Сводные данные - соматические варианты, выявление инделов

Тип варианта	Ожидаемые варианты	TP	FN	Нераспознанные варианты	PPA
Инсерция	10773	10282	9	482	99,2
Делеция	11502	10667	5	830	> 99,9

Для покрытия областей с различным геномным составом были разработаны 150 ампликонов. GC-состав ампликонов варьировался в диапазоне 0,19-0,87. Ампликоны также содержали повторы одного нуклеотида (т.е. поли(А), поли(Т)...), динуклеотидов и тринуклеотидов. Данные компилировали для каждого ампликона (таблица 17), чтобы определить влияние геномного состава на процент правильных распознаваний. Процент правильных распознаваний включает в себя распознанные и референтные варианты и составляет менее 100 % при наличии неправильных распознаваний или нераспознанных вариантов.

Таблица 17. Соматические варианты - точность на уровне ампликона

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли А (5), ПолиС (5), индел	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли Т (10), индел	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли А (5), СТ(3), ТАА (3), индел	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли А (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли Т (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли Т (5), индел	0,31	32524	9	718	97,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли Т(5), поли А(6), индел	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли Т (5), индел	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли А (5), ПолиТ (5), Поли А (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли А(6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли G (6), Поли Т (5), Поли А (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли А (5), индел	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли А (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли А (7), индел	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли А (6), индел	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли Т (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	СТ(5), индел	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли Т (5), ТСТ(3), СТТ(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли С (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли G (5), индел	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли А (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли А (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли G (5), индел	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли G (6), Поли С (6), индел	0,71	34316	0	82	99,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли G (7), CTC(4), индел	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли C (6), индел	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли G (5), индел	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Поли T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли A (5), ПолиT (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	23368	0	68	99,7

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли А (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли А (5), СА(3), индел	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли С (5), индел	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли А (7), АС(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли А (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли А (5), ПолиТ (7), Поли А (7), индел	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли Т (5), индел	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	34313	0	86	99,7

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли А (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли С (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли G (5), индел	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли Т (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли С (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли С (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли Т (5), индел	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли С (5), индел	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли Т (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли А (13), индел (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли А (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли А(7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), индел	0,26	34367	0	418	98,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли Т (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А(6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли А (5), индел	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	СТ(3), индел	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли Т (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли A(6), AG(3), индел	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли Т (5), Поли А (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли Т (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли С (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли А (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Результаты секвенирования образца GM12878 сравнивали с надежно установленным Национальным институтом стандартов и технологий (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (v.2.19) генотипом NA12878. Из 150 ампликонов 92 ампликона полностью лежали в надежно установленных областях генома, 41 ампликон частично перекрывался с ними, а 17 ампликонов не перекрывались с последовательностью NIST. Это привело к 10000 координат на повторность для сравнения. Невариантные распознавания сравнивали с эталонной последовательностью генома человека, сборкой hg19. Результаты в отношении точности представлены в таблице 18.

Таблица 18. Согласованность соматических вариантов в образце GM12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средний уровень распознавания	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

На основании данных этого исследования соматических вариантов в 9 прогонах, секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет получать согласованные данные секвенирования при следующем составе:

- ▶ GC-состав ≥ 19 % (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах с GC-составом в 19 % распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 2,6 %)
- ▶ GC-состав ≤ 87 % (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах с GC-составом в 87 % распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,6 %)
- ▶ Поли-А длиной ≤ 9 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-А длиной 9 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 2,5 %)
- ▶ Поли-Т длиной ≤ 10 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Т длиной 10 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,1 %)
- ▶ Поли-Г длиной ≤ 6 (все распознанные основания в 2268 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Г длиной 7 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,5 %)
- ▶ Поли-С длиной ≤ 6 (все распознанные основания в 756 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-С длиной 6 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,4 %)
- ▶ Повторы динуклеотидов длиной $\leq 4x$ (все распознанные основания в 1890 секвенированных ампликонах, содержащих повторы динуклеотидов длиной 4x, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,9 %)
- ▶ Повторы тринуклеотидов длиной $\leq 5x$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторы тринуклеотидов длиной 5x, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 1,4 %)
- ▶ Инделы длиной ≤ 23 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих инделы длиной 23 основания, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,8 %)
- ▶ Делеции длиной ≤ 25 (все распознанные основания в 1134 секвенированных ампликонах, содержащих делеции длиной 25 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил 0,7 %)

Прецизионность

Прецизионность секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx определяли путем тестирования 13 уникальных образцов проекта Platinum Genome с использованием трех приборов, трех партий реагентов тремя операторами при генерировании девяти последовательностей за пять дней прогонов. Репрезентативный анализ, образцы и референтный метод - те же, как описано для исследования точности при анализе герминальных вариантов. Прецизионность определяли с помощью дисперсионного анализа компонентов с использованием VAF в качестве переменной отклика и расчета стандартных отклонений на уровне компонентов для прибора, партии реагентов, оператора и дня начала прогона (таблица 19). Общее число наблюдений, использованных в анализе для каждого компонента изменчивости инструмента, оператора и партии реагента, составило 699, 176 и 235 для SNV, инсерций и делеций, соответственно.

Таблица 19. Результаты анализа прецизионности секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (стандартное отклонение)

Компонент	Тип варианта	Компонент SD		Всего SD	
		Max	Медиана	Max	Медиана
Партия	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Инсерция	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Делеция	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Прибор	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Инсерция	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Делеция	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Оператор	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Инсерция	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Делеция	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
День	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Инсерция	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Делеция	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Сравнение методов (платформа для секвенирования)

Образцы из цельной крови и FFPE оценивали на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и генетическом секвенаторе MiSeqDx с использованием протоколов для герминальных и соматических вариантов набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения. Согласованность в отношении частоты вариантов для образцов крови и FFPE оценивали при использовании нескольких репрезентативных анализов. На рисунке 2 показана корреляция VAF между двумя приборами для одного репрезентативного анализа, а в таблице 20 показана корреляция по панели анализа. На основании сильной корреляции между генетическим секвенатором MiSeqDx и секвенатором нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx рабочие характеристики, связанные с преаналитическими факторами (в т.ч. методами выделения или присутствием посторонних веществ), определены как применимые к обоим приборам. Дополнительную информацию см. в инструкции по применению для набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx в вариантах исполнения.

Рисунок 2. Корреляция VAF генетического секвенатора MiSeqDx и секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx для образцов FFPE (слева) и крови (справа) при использовании метода 1

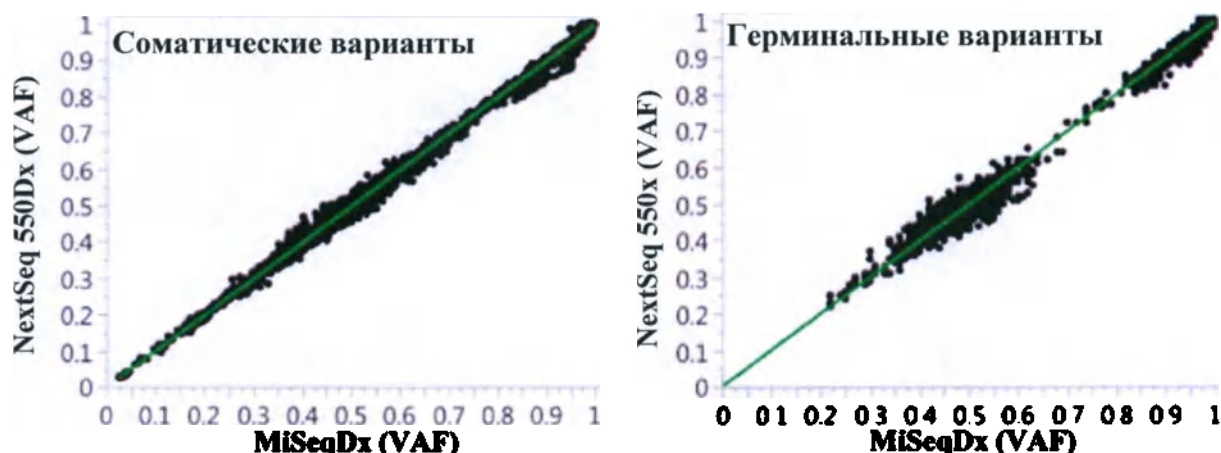


Таблица 20. Сравнение результатов метода при использовании уникальных образцов крови и FFPE

Источни к гДНК	Анализ (панель олигонуклеотид ов)	Биологическ е повторности (образцы)	Техническ е повторнос ти (на образец)	Наблюден ия (число вариантов)	Накло н	Точка пересечен ия	Корреляц ия (R^2)
Кровь	Анализ 1	45	2	83691	0,992	0,002	0,9952
Кровь	Анализ 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Анализ 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,9972
FFPE	Анализ 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹ Два значения были удалены на основании указанного ограничения модуля для герминальных вариантов.

² Коэффициент смешанной корреляции для графиков VAF, как показано на рисунке 2.

Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов, полученных с помощью секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx оценивали при тестировании образцов Platinum Genome с помощью репрезентативного анализа, направленного на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах. Тестирование герминальных вариантов включало семь повторностей 13 образцов; исследование соматических вариантов - шесть повторностей семи образцов разных VAF. Образцы готовили с использованием набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения.

Тестирование проводили в трех внешних лабораториях с использованием одной партии набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). В каждой лаборатории использовали один секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. В каждой лаборатории исследования проводили два оператора. Каждый оператор выполнил тестирование в течение трех непоследовательных дней начала прогона для каждого типа образца, в общей сложности 36 прогонов в трех лабораториях. В результате этого тестирования было проведено 18 прогонов для каждого протокола (для герминальных и соматических вариантов).

Герминальные варианты

Герминальные варианты с $VAF \geq 0,2$ сообщаются как положительные (вариант). Для ожидаемых положительных герминальных вариантов данные оценивали для уровней нераспознавания и правильного положительного распознавания для каждого типа

варианта (SNV, инсерция, делеция). В таблице 21 приведены наблюдаемые уровни вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона для каждого типа варианта.

Таблица 21. Наблюдения распознавания герминальных вариантов для ожидаемых положительных результатов по типу варианта

Тип варианта	Не распознано			Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Инсерции	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Делеции	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Герминальные варианты с уровнями VAF < 0,2 сообщаются как отрицательные (дикого типа). Для ожидаемых отрицательных позиций герминальных вариантов данные оценивали для уровней нераспознавания и правильного распознавания дикого типа. В таблице 22 приведены наблюдаемые уровни вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона.

Таблица 22. Наблюдения распознавания герминальных вариантов для ожидаемых отрицательных результатов

Тип варианта	Не распознано			Правильное отрицательное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
Дикий тип	4883	19600182	0,025	19595299	19595299	100	100,00	100,00

Герминальные варианты с VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ расцениваются как положительные гетерозиготные по варианту, а варианты с уровнем VAF $\geq 0,7$ - как положительные гомозиготные по варианту. Для определения того, повлияет ли внутренняя вариабельность метода на распознавание генотипа, использовали образцы с гетерозиготными герминальными вариантами. Сх определяли для обоих отсечений (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов), где x - доля повторных тестов, значения которых превышают уровень отсечения. Для нижнего отсечения, 0,2 VAF, Сх был $\geq 99,999\%$, что указывает на то, что 99,999% гетерозиготных вариантов будут расценены как гетерозиготные. Для верхнего отсечения, 0,7 VAF, Сх был $\leq 0,001\%$, что указывает на то, что $\leq 0,001\%$ гетерозиготных вариантов будут расценены как гомозиготные. В таблице 23 результаты обобщены по типу вариантов.

Герминальные варианты с VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ расцениваются как положительные гетерозиготные по варианту, а варианты с уровнем VAF $\geq 0,7$ - как положительные гомозиготные по варианту. Для определения того, повлияет ли внутренняя вариабельность метода на распознавание генотипа, использовали образцы с гетерозиготными герминальными вариантами. Сх определяли для обоих отсечений (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов), где x - доля повторных тестов, значения которых превышают уровень отсечения. Для нижнего отсечения, 0,2 VAF, Сх был $\geq 99,999\%$, что указывает на то, что $\geq 99,999\%$ гетерозиготных вариантов будут расценены как гетерозиготные. Для верхнего отсечения, 0,7 VAF, Сх был $\leq 0,001\%$, что указывает на то, что $\leq 0,001\%$ гетерозиготных вариантов будут расценены как гомозиготные. В таблице 23 результаты обобщены по типу вариантов.

Таблица 23. Герминальные варианты - значения Cx для гетерозиготных вариантов

Тип варианта	Отсечка при 0,2 VAF	Отсечка при 0,7 VAF
	$\geq C99,999 \%$	$\leq C0,001 \%$
SNV	94/94	94/94
Инсерции	24/24	24/24
Делеции	35/35	35/35
Всего	153	153

Соматические варианты

Соматические варианты с $VAF \geq 0,026$ сообщаются как положительные (вариант). Наблюдения с уровнями $VAF \geq 0,01$ и $< 0,026$ считались сомнительными в отношении целей данного анализа (ни положительными, ни отрицательными, помеченными как варианты с низкой частотой). Для оценки рабочих характеристик результаты рассчитывали тремя способами:

- ▶ Наилучший случай: любой сомнительный результат считался правильным положительным распознаванием (соответствие ожидаемому результату)
- ▶ Наихудший случай: любой сомнительный результат считался неправильным распознаванием (несоответствие ожидаемому результату)
- ▶ Случай с исключением: все сомнительные результаты исключали из анализа.

В трех таблицах, таблице 24, таблице 25 и таблице 26, обобщены результаты распознавания для наилучшего случая, наихудшего случая и случая с исключением, соответственно, вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона.

Таблица 24. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых положительных результатов (наилучший случай)

Тип варианта	Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица 25. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых положительных результатов (наихудший случай)

Тип варианта	Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица 26. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых положительных результатов (исключение сомнительных распознаваний)

Тип варианта	Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Соматические варианты с VAF < 0,01 сообщаются как отрицательные (дикого типа). Для ожидаемых отрицательных позиций соматических вариантов данные оценивали для уровней нераспознавания и правильного распознавания дикого типа. Правильные распознавания дикого типа определяли путем исключения нераспознаваний и вычитания наблюдаемых распознаваний, попавших в сомнительную зону (уровни VAF $\geq 0,01$ и < 0,026), а также неправильных распознаваний выше отсечения (уровни VAF $\geq 0,026$) из общего числа. В таблице 27 обобщены наблюдаемые результаты, всего и в процентах, для отрицательных позиций соматических вариантов для уровня нераспознавания и правильного распознавания дикого типа вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона.

Таблица 27. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых отрицательных результатов

Тип варианта	Не распознано			Правильное распознавание						
	Полученный результат	Всего	Процент	Сомнительные результаты	Неправильно	Правильно	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
Дикий тип	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Для определения C95 анализа (в пределах каждого типа варианта) оценивали образцы соматических вариантов с разными VAF. Для оценки изменчивости вблизи отсечения использовали образцы с ожидаемыми VAF между 0,02 и 0,07. C95 определяли для каждого варианта, наивысшее значение C95 для каждого типа вариантов представлено в таблице 28.

Таблица 28. Соматические варианты - сводные результаты по C95

Тип варианта	N	C95
SNV	74	0,0613
Инсерция	24	0,0573
Делеция	33	0,0575

Рабочие характеристики набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles))

Общие сведения

Два типа наборов реагентов предназначены для работы с секвенатором нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx: набор реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) и набор реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)). Чтобы продемонстрировать, что набор реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) может соответствовать требованиям к рабочим характеристикам, проверенным и подтвержденным для набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)), провели исследования с набором реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)). Используя набор реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИБД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения, приготовили две библиотеки, одну с использованием протокола для герминальных вариантов, и одну - с использованием протокола для соматических вариантов. Библиотеки, приготовленные с использованием

обоих рабочих процессов, тестировали, используя три партии набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) и три секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Кроме того, тестирование каждого протокола включало один прогон с использованием набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)).

Аналитическая чувствительность (уровень фона [предел холостой пробы, LoB] и предел обнаружения [LoD])

Верификация набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) показала, что секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx может обнаруживать варианты при 0,05 VAF с ошибкой типа II $\leq 0,05$ и что отсеечение 0,026 VAF, используемое модулем соматических вариантов (эффективный LoB), поддерживает ошибку типа I $\leq 0,01$. На основании этих результатов ожидается, что результаты варианта с VAF 0,05 больше или равны результатам варианта с VAF 0,026 в 95% случаев и что VAF позиции дикого типа менее 0,026 в 99% случаев. Чтобы убедиться, что эти требования выполняются при использовании набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)), были проведены повторные измерения на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с образцами дикого типа (образцы LoB) и с образцами, содержащими варианты с VAF 0,05 (образцы LoD) с использованием набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)).

Затем доли распознаваний при VAF выше или ниже 0,026 сравнивали с таковыми, установленными для набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)).

Тестирование включало два образца LoD, каждый с уникальным набором вариантов с целевым значением VAF 0,05, и соответствующие образцы LoB с целевыми вариантами дикого типа. При приготовлении библиотек образцы LoD и LoB обрабатывали в повторностях по восемь и семь соответственно с использованием набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИБД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx. Первоначально библиотеки секвенировали с использованием набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для идентификации вариантов/координат генома для оценки LoB/LoD при использовании набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)). Все варианты со средним значением VAF между 0,045 - 0,055 (варианты LoD) по результатам использования набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles))) использовали для анализа LoD (N = 51 вариант). При анализе LoB оценивали 51 соответствующую координату генома.

Для оценки набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) библиотеки секвенировали в трех прогонах в течение трех последовательных дней с использованием одного и того же инструмента, и партии набора реагентов. Объем тестирования составил 24 повторности для каждого из 51 варианта LoD и 21 повторность для каждой из соответствующих позиций дикого типа. Доля распознаваний вариантов дикого типа с VAF < 0,026 представлена в таблице 29. Доля распознаваний вариантов LoD с VAF больше или равной 0,026 представлена в таблице 30.

Таблица 29. Доля распознаваний < 0,026 для позиций дикого типа (оценка заявленного значения LoB)

Тип варианта	Оцененные позиции	Всего наблюдений	Число измерений VAF ≥ 2,6 %	Доля < 2,6 %	Доля 95 % доверительные интервалы
SNV	32	672	0	1	0,994-1
Инсерция	11	231	0	1	0,984-1
Делеция	8	168	0	1	0,978-1

Таблица 30. Доля распознаваний ≥ 0.026 VAF для вариантов LoD (оценка заявленного значения LoD)

Тип варианта	Оцененные позиции	Всего наблюдений	№ измерений VAF < 2,6 %	Число измерений VAF ≥ 2,6 %	Доля ≥ 2,6 %	Доля 95 % доверительные интервалы
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993-1
Инсерция	11	264	3	261	0,989	0,967-0,996
Делеция	8	192	2	190	0,99	0,963-0,997

Точность

Герминальные варианты

Для оценки точности распознавания вариантов было проведено следующее исследование с использованием модуля для герминальных вариантов и набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)). В репрезентативном анализе тестировали 12 уникальных образцов из проекта Platinum Genome. Всего было выполнено 11 прогонов с использованием трех секвенаторов нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и трех наборов реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)).

Точность в отношении SNV, инсерций и делеций определяли путем сравнения результатов с хорошо охарактеризованным референтным методом, Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Точность при проведении одного прогона секвенирования с набором реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) предоставлена в качестве референтной. Сводные результаты представлены в таблице 31.

Таблица 31. Герминальные варианты - сводные результаты по согласованности

Критерии	Всего наблюдений (v2.5) ¹	Результат по наблюдениям (v2.5) ²	Результат по наблюдениям (v2) ³	Результат по прогонам (v2.5) ⁴	Результат по прогонам (v2) ⁴
PPA для SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA для инсерций	1056	100	100	100	98,9
PPA для делеций	1056	95,2	95,2	> 99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Рассчитывается как число образцов на прогон x число прогонов (96 образцов на прогон x 11 прогонов = 1056 наблюдений).

²Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца во всех прогонах (на основании 11 прогонов при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles))).

³Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца в 1 прогоне (всего 96 наблюдений).

⁴Наименьшее значение при анализе данных всех прогонов в совокупности.

Соматические варианты

Для оценки точности распознавания вариантов было проведено следующее исследование с использованием модуля для соматических вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)). В репрезентативном анализе тестировали 10 FFPE образцов (два - с вариантами, разведенными до 0,05 VAF) из проекта Platinum Genome. Всего было выполнено 11 прогонов с использованием трех секвенаторов нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и трех наборов реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)).

Точность в отношении SNV, инерций и делеций определяли путем сравнения результатов с хорошо охарактеризованным референтным методом, Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Точность при проведении одного прогона секвенирования с набором реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) предоставлена в качестве референтной. Сводные результаты представлены в таблице 32.

Таблица 32. Соматические варианты - сводные данные по согласованности

Критерии	Всего наблюдений (v2.5) ¹	Результат по наблюдениям (v2.5) ²	Результат по наблюдениям (v2) ³	Результат по прогонам (v2.5) ⁴	Результат по прогонам (v2) ⁴
PPA для SNV	528	100	100	100	100
PPA для инсерций	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA для делеций	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Рассчитывается как число образцов на прогон x число прогонов (48 образцов на прогон x 11 прогонов = 528 наблюдений).

²Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца во всех прогонах (на основании 11 прогонов при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)).

³Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца в 1 прогоне (всего 96 наблюдений).

⁴Наименьшее значение при анализе данных всех прогонов в совокупности.

Прецизионность

Герминальные варианты

Прецизионность набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) с модулем для герминальных вариантов оценивали с использованием образцов проекта Platinum Genome и репрезентативного анализа. Тестирование состояло из подготовки одной библиотеки с использованием набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения и включало 12 обработанных образцов, восемь повторностей для каждого. Библиотеки секвенировали с использованием трех партий набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) и трех секвенаторов нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, девять прогонов в целом.

Для определения того, повлияет ли внутренняя вариабельность метода на распознавание генотипа, использовали образцы с гетерозиготными соматическими вариантами (153

уникальных гетерозиготных вариантов). Сх определяли для обоих отсечений модуля для герминальных вариантов (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов), где х - доля повторных тестов, значения которых превышают уровень отсечения. Для нижнего отсечения, 0,2 VAF, доля вариантов с минимальным значением Сх для набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) составила > 99,9%, что указывает на то, что > 99,9% гетерозиготных вариантов будут квалифицированы как гетерозиготные. Для верхнего отсечения, 0,7 VAF, доля вариантов с максимальным значением Сх для набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) составила < 1,5%, что указывает на то, что ≤ 1,5% гетерозиготных вариантов будут квалифицированы как гомозиготные. В таблице 33 результаты обобщены по типу вариантов. Значения Сх в одном прогоне секвенирования с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) предоставлены в качестве референтных.

Таблица 33. Герминальные варианты - значения Сх для гетерозиготных вариантов

Тип варианта	N	Отсечка при 0,2 VAF		Отсечка при 0,7 VAF	
		Min Cx (v2.5) ¹	Min Cx (v2) ²	Max Cx (v2.5) ¹	Max Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Инсерции	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Делеции	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

¹Значения Сх на основании оценок общего стандартного отклонения при анализе компонентов дисперсии.

²Значения Сх по данным стандартного отклонения для образцов.

Соматические варианты

Прецизионность набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) с модулем для соматических вариантов оценивали с использованием образцов проекта Platinum Genome и репрезентативного анализа. Тестирование состояло из подготовки одной библиотеки с использованием набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения и включало 2 образца, восемь повторностей для каждого. Библиотеки секвенировали с использованием трех партий набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) и трех секвенаторов нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, девять прогонов в целом.

Соматические варианты с ожидаемыми уровнями VAF ≤ 0,10 (N = 131 уникальный вариант) использовали для оценки вариативности прибора вблизи значения отсечения для соматических вариантов (соматические варианты с уровнем VAF ≥ 0,026 распознаются как положительные). Для каждого соматического варианта определяли значение C95. Значения C95 представляют собой значения VAF, при которых вероятность превышения значения отсечения для соматического варианта составляет 95%. Наивысшие значения C95 по типу вариантов приведены в таблице 34. Значения C95 при проведении одного прогона секвенирования с набором реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) предоставлены в качестве референтных.

Таблица 34. Соматические варианты - сводные результаты по C95

Тип варианта	№ оцененных вариантов	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Инсерции	24	0,062	0,061
Делеции	33	0,060	0,060

¹Значения C95 на основании оценок общего стандартного отклонения при анализе компонентов дисперсии.

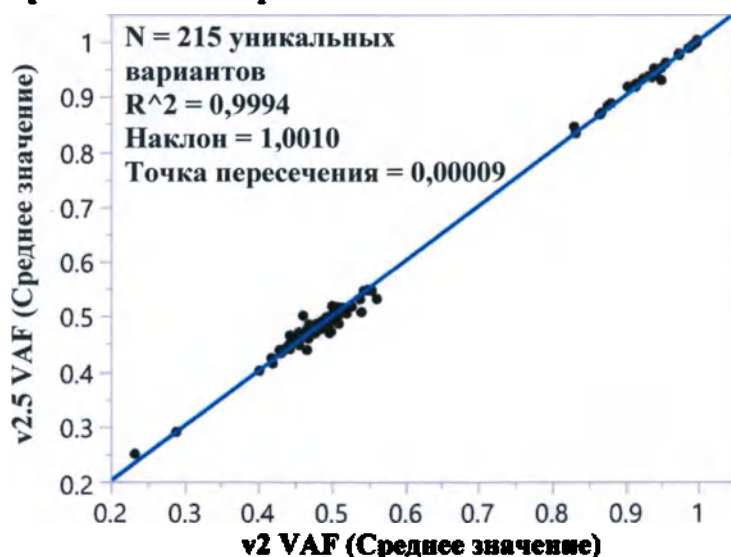
²Значения C95 по данным стандартного отклонения для образцов.

Сравнение методов (набор реагентов)

Герминальные варианты

Средние значения VAF для 215 уникальных вариантов оценивали при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) и набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)), использовали результаты модуля для герминальных вариантов. Среднее значение VAF рассчитано на основании 11 прогонов секвенирования (v2.5) и одного прогона секвенирования (v2). Для расчета среднего значения для каждого варианта использовали как минимум 8 повторностей. На рисунке 3 показана корреляция VAF между двумя наборами реагентов. На основании выраженной линейной корреляции значений VAF и сходства результатов при использовании обоих наборов реагентов, рабочие характеристики, первоначально верифицированные и валидированные при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) с модулем для герминальных вариантов, применимы к набору реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)).

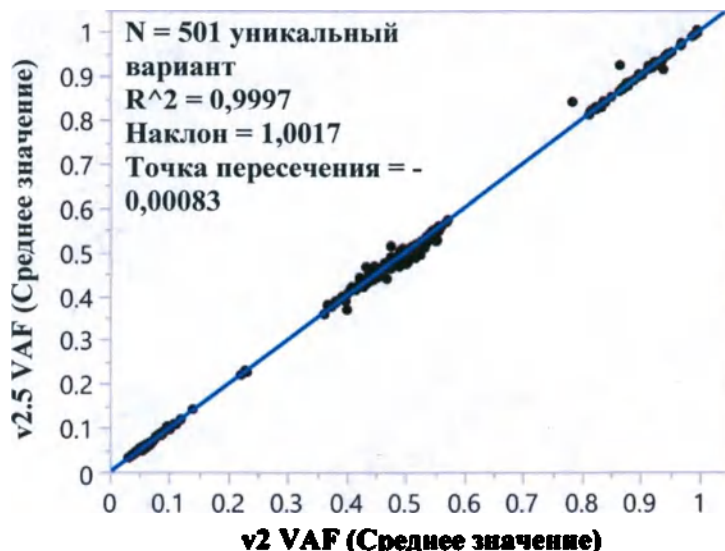
Рисунок 3. Корреляция частот аллелей (VAF) при использовании наборов реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) и наборов реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)), модуль для герминальных вариантов



Соматические варианты

Средние значения VAF для 501 уникального варианта оценивали при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) и набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)), использовали результаты модуля для соматических вариантов. Среднее значение VAF рассчитано на основании 11 прогонов секвенирования (v2.5) и одного прогона секвенирования (v2). Для расчета среднего значения для каждого варианта использовали как минимум 3 повторности. На рисунке 4 показана корреляция VAF между двумя наборами реагентов. На основании выраженной линейной корреляции значений VAF и сходства результатов при использовании обоих наборов реагентов, рабочие характеристики, первоначально верифицированные и валидированные при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) с модулем для соматических вариантов, применимы к набору реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)).

Рисунок 4. Корреляция частот аллелей (VAF) при использовании наборов реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) и наборов реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)), модуль для соматических вариантов



История изменений

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000030326 в.06	Май 2022 г.	Обновления для исправления содержимого, случайно добавленного из исходного программного обеспечения.
Документ № 1000000030326 в.05	Ноябрь 2021 г.	Добавлены предупреждения и меры предосторожности в отношении сообщений о серьезных инцидентах. В Принципы процедуры добавлено заявление с указанием предполагаемого пользователя. Удалена ссылка на набор реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот. Добавлена ссылка на набор реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот.
Документ № 1000000030326 в.04	Август 2021 г.	Добавлена таблица Истории изменений. Обновлено адрес Уполномоченного представителя ЕС.

Патенты и торговые марки

Этот документ и его содержимое являются собственностью компании «Иллюмина Инк.» (Illumina, Inc.) и ее филиалов («Illumina») и предназначены исключительно для использования клиентами согласно договору, в связи с использованием продукта (ов), описанного (ых) в настоящем документе, и ни для каких-либо других целей. Этот документ и его содержимое не должны использоваться или распространяться для каких-либо иных целей и/или иным образом, передаваться, раскрываться или воспроизводиться каким-либо образом без предварительного письменного согласия Illumina. Настоящим документом Illumina не передает какую-либо

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

лицензию в соответствии со своими патентами, товарными знаками, авторскими правами или правами общего права или аналогичные права каких-либо третьих сторон.

Инструкции в этом документе должны строго и четко соблюдаться квалифицированным и должным образом обученным персоналом для обеспечения надлежащего и безопасного использования продуктов, описанных в данном документе. Все содержимое этого документа должно быть полностью прочитано и понято до использования этого (их) продукта (ов).

НЕПРОЧТЕНИЕ И НЕТОЧНОЕ ВЫПОЛНЕНИЕ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ ЗДЕСЬ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ПРОДУКТА(ОВ), ТРАВМАМ ЛЮДЕЙ, ВКЛЮЧАЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ДРУГИХ ЛИЦ, И ПОРЧЕ ИМУЩЕСТВА И ПРЕКРАЩАЕТ ДЕЙСТВИЕ ГАРАНТИЙНЫХ ОБЯЗАТЕЛЬСТВ В ОТНОШЕНИИ ПРОДУКТА (ОВ).

ILLUMINA НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ В СЛУЧАЕ НЕНАДЛЕЖАЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТА (ОВ), ОПИСАННЫХ ЗДЕСЬ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТИ ИЛИ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ).

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

Все товарные знаки являются собственностью Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Детальную информацию о торговых марках см. по ссылке www.illumina.com/company/legal.html.

Контактная информация



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



Illumina Netherlands B. V.
Steenhoven 19, 5626 DK Eindhoven,
The Netherlands (Нидерланды)

Спонсор в Австралии
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association
Building Level 3, 535
Elizabeth Street Melbourne,
VIC 3000
Australia (Австралия)

Маркировка продукта

Полный список символов, которые могут находиться на упаковке продукта и маркировке, см. в описании символов по адресу support.illumina.com

Данное руководство по эксплуатации предназначено для Российской Федерации (РФ) и незначительно отличается от руководства по эксплуатации для Соединенных Штатов Америки (США), различия не затрагивают назначение и принципов процедуры медицинского изделия.

Перевод с английского языка на русский язык

/Большая печать штата Мэриленд/

Штат Мэриленд

Канцелярия секретаря штата

Настоящий апостиль недействителен для использования в Соединенных Штатах Америки, на территориях и во владениях, принадлежащих данному государству.
Настоящий апостиль не удостоверяет содержание документа, в отношении которого он выдан.

Apostille (Апостиль)

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961 (Гаагская конвенция от 5 октября 1961 г.))

1. Страна: Соединенные Штаты Америки
Настоящий официальный документ
2. Подписан Скоттом А. Поьером (Scott A. Poyer)
3. Выступающим в качестве секретаря Окружного суда
4. Скреплен печатью/штампом секретаря Окружного суда округа Анн-Арандел
Удостоверено
5. В г. Аннаполисе, штат Мэриленд
6. 22 сентября 2022 г.
7. Секретарем штата Мэриленд
8. За № 613660
9. Место печати:

/Печать/: ПЕЧАТЬ КАНЦЕЛЯРИИ
СЕКРЕТАРЯ ШТАТА * МЭРИЛЕНД

10. Подпись:
/Подпись/
Секретарь штата

Штат Мэриленд, округ Анн-Арандел

Я, СКОТТ А. ПОЙЕР, секретарь Окружного суда округа Анн-Арандел, штат Мэриленд, который является судом письменного производства, настоящим подтверждаю, что **Ахмад Миски** является должным образом назначенным, уполномоченным и квалифицированным нотариусом, действующим с 10 мая 2021 г.

**В подтверждение вышесказанного я собственноручно
подписал и скрепил печатью суда настоящий документ
22 сентября 2022 г.**

/Подпись/

**Скотт А. Пойер, секретарь
Окружной суд округа Анн-Арандел, штат Мэриленд**

/Печать/: **ОКРУЖНОЙ СУД ОКРУГА АНН-АРАНДЕЛ * ШТАТ
МЭРИЛЕНД**

/Логотип/: «Иллюмина, Инк.»

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)

*/Штамп/: Настоящим я, Ханади Аджами, подтверждаю, что данный документ является оригиналом. *
/Подпись/ * Штат Мэриленд, округ Анн-Арандел * Подписано Ханади Аджами под присягой в моем
присутствии. * Ахмад Миски * Нотариус /Подпись/ * 22 сентября 2022 г. * Срок действия полномочий
истекает 28 мая 2025 г.*

*/Печать/: ШТАТ МЭРИЛЕНД * ОКРУГ АНН-АРАНДЕЛ * НОТАРИУС * АХМАД МИСКИ*

Руководство по эксплуатации

Производитель:

«Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.)

Адрес:

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200
Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

*/Штамп/: ЛИВАЙ П. ХОУП *
Нотариус, штат Калифорния *
Округ Сан-Диего *
Лицензия № 2377029 *
Срок действия полномочий
истекает 30 сентября 2025 года*

От имени компании «Иллюмина, Инк.»

/Подпись/

Дата 22 сентября 2022 г.

**Аурелия Браунридж (Aurelia
Brownridge),**

**старший специалист отдела по
вопросам нормативно-
правового регулирования
«Иллюмина, Инк.»**

**ОФИЦИАЛЬНОЕ ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНИЕ
ШТАТА КАЛИФОРНИЯ**

§ 1189 ГРАЖДАНСКОГО КОДЕКСА

Нотариус или другое должностное лицо, заполнившее настоящее свидетельство, удостоверяет только личность лица, подписавшего документ, к которому приложено настоящее свидетельство, а не достоверность, правильность или действительность указанного документа.

Штат Калифорния
Округ САН-ДИЕГО
22.09.2022

ко мне, ЛИВАЮ П. ХОУПУ, НОТАРИУСУ,

Дата Указать имя, фамилию и должность официального лица
лично явилась АУРЕЛИЯ БРАУНРИДЖ (AURELIA BROWNRIDGE)
Имя, фамилия лица, подписавшего документ

которая представила мне убедительные доказательства того, что она является лицом, чье имя указано в прилагаемом документе, и заверила меня, что имеет полномочия выступать в данном качестве и что путем проставления ее подписи в прилагаемом документе физическое или юридическое лицо, от имени которого она выступает, считается подписавшим такой документ.

*Штамп: ЛИВАЙ П. ХОУП **
*Нотариус, штат Калифорния **
*Округ: Сан-Диего **
*Лицензия № 2377829 **
Срок действия полномочий истекает 30 сентября
2025 года

Будучи предупрежденным о НАКАЗАНИИ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ в соответствии с законами штата Калифорния, я удостоверяю, что информация в вышеприведенном разделе является правильной и точной.

ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНО моей подписью и официальной печатью.

Подпись: */Подпись/*

Место печати и (или) штампа нотариуса

Подпись нотариуса

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Заполнение информации в данном разделе может предотвратить внесение изменений в документ или неправомерное присоединение данной формы к другому документу.

Описание приложенного документа

Название или тип документа: РУКОВОДСТВО ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ

Дата документа:

Количество страниц:

Подписавшие документ лица, не указанные выше:

Полномочия, заявленные лицами, подписавшими документ

Имя, фамилия лица, подписавшего документ:

Имя, фамилия лица, подписавшего документ:

☐ Должностное лицо компании, должность:

☐ Должностное лицо компании, должность:

☐ Партнер: – ☐ с ☐ полный

☐ Партнер: – ☐ с ☐ полный

ограниченной
ответственностью

ограниченной
ответственностью

☐ Физическое лицо ☐ Лицо, действующее по
доверенности

☐ Физическое лицо ☐ Лицо, действующее по
доверенности

☐ Доверительный ☐ Опекун или попечитель
управляющий

☐ Доверительный ☐ Опекун или попечитель
управляющий

☐ Другое:

☐ Другое:

Лицо, подписавшее документ, представляет:

Лицо, подписавшее документ, представляет:

©2019 г. Национальная ассоциация нотариусов

/Надпись на наклейке/: Россия. 208592

Перевод данного текста выполнен мной, переводчиком Тумановым Владимиром Олеговичем.



Российская Федерация

Город Москва

Семнадцатого октября две тысячи двадцать второго года.

Я, Якубова Татьяна Олеговна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Туманова Владимира Олеговича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

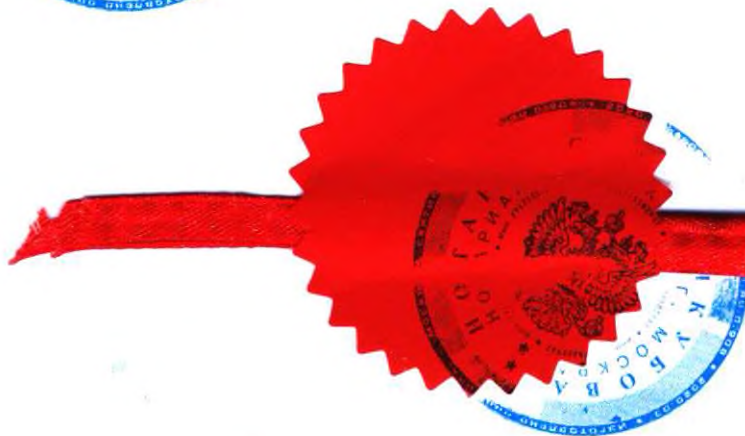
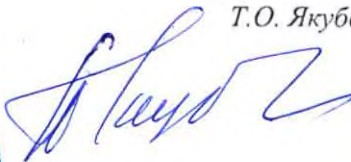
Зарегистрировано в реестре: № 77/2171-н/77-2022- 51-125

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 62 лист(а)(ов)

Нотариус

Т.О. Якубова





The State of Maryland

Office of the Secretary of State

This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions.

This Apostille does not certify the content of the document for which it is issued.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by **Scott A. Poyer**
3. acting in the capacity of **Clerk of the Circuit Court**
4. bears the seal/stamp of the **Clerk of Circuit Court of Anne Arundel County**

Certified

5. at Annapolis, Maryland
6. the **22nd day of September, 2022**
7. by The Secretary of State of Maryland

8. No. 613661

9. Seal



10. Signature

Secretary of State

Sequencer nucleic acids NextSeq™ 550Dx, a new generation sequencing method (NGS)

I, Hanadi Ajami, hereby certify
that this is an original document.

State of Maryland, Anne Arundel County
Subscribed and Sworn to before me by
Hanadi Ajami.



263674

State of Maryland, Anne Arundel County, Sct.

I, **SCOTT A. POYER**, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that **Ahmad Miski** was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 10th day of May, 2021.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the
seal of the court September 22, 2022

Scott A. Poyer

Scott A. Poyer, Clerk
Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland



illumina

Sequencer nucleic acids NextSeq™ 550Dx, a new generation sequencing method (NGS)

I, Hanadi Ajami, hereby certify
that this is an original document.

State of Maryland Anne Arundel County
Subscribed and Sworn to before me by
Hanadi Ajami.

Ahmad Miski
Notary Public

SEP 22 2022

My Commission expires on May 28, 2025



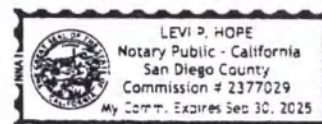
Reference guide

Manufacturer:

Illumina, Inc

Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA



On behalf of Illumina, Inc.


Aurelia Brownridge

Date September 22, 2022

CALIFORNIA ACKNOWLEDGMENT

CIVIL CODE § 1189

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California

County of SAN DIEGO

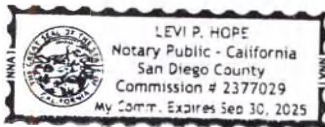
On 09/22/2022 before me, LEVI P HOPE, NOTARY PUBLIC
Date Here Insert Name and Title of the Officer

personally appeared AURELIA BROWNRIDGE
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.



Signature Levi P Hope
Signature of Notary Public

Place Notary Seal and/or Stamp Above

OPTIONAL

Completing this information can deter alteration of the document or fraudulent reattachment of this form to an unintended document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: REFERENCE GUIDE

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer – Title(s): _____

☐ Partner – ☐ Limited ☐ General

☐ Individual ☐ Attorney in Fact

☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer – Title(s): _____

☐ Partner – ☐ Limited ☐ General

☐ Individual ☐ Attorney in Fact

☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)

Руководство справочное



Документ № 1000000009513 в. 07
Октябрь 2021 г.
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

СОБСТВЕННАЯ ИНФОРМАЦИЯ ILLUMINA

Данный документ и его содержание являются собственностью компании «Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.) и ее отделений («Иллюмина») и предназначены для использования заказчиком исключительно по условиям договора в связи с применением описанного(ых) в настоящем документе изделия(й), но никоим образом не предназначены для иных целей. Использование или распространение данного документа и его содержания для какой-либо иной цели и/или передача, раскрытие или какое-либо воспроизведение его содержания без письменного согласия компании «Иллюмина» не допускается. Компания «Иллюмина» не передает третьей стороне какие-либо лицензионные или иных права на данный документ, гарантированные патентом, товарным знаком, авторским правом или законодательством.

В целях обеспечения правильного и безопасного использования описанного(ых) в настоящем документе изделия(й) квалифицированному персоналу, прошедшему надлежащую подготовку, необходимо строго и точно соблюдать приведенные здесь инструкции. Перед использованием такого(их) изделия(й) необходимо полностью прочитать и понять все содержание данного документа.

НЕПОЛНОЕ ПРОЧТЕНИЕ И НЕТОЧНОЕ СЛЕДОВАНИЕ ВСЕМ СОДЕРЖАЩИМСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ ИНСТРУКЦИЯМ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ(Й), ТРАВМИРОВАНИЮ ПЕРСОНАЛА, ВКЛЮЧАЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ИЛИ ИНЫХ СОТРУДНИКОВ, И К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИНОГО ИМУЩЕСТВА, И В ДАННОМ СЛУЧАЕ КАКИЕ-ЛИБО ГАРАНТИИ В ОТНОШЕНИИ ДАННОГО ИЗДЕЛИЯ(Й) БУДУТ НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ.

КОМПАНИЯ «ИЛЛЮМИНА» НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПИСАННОГО(ЫХ) В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ ИЗДЕЛИЯ(Й) (В ТОМ ЧИСЛЕ ЕГО (ИХ) ДЕТАЛЕЙ ИЛИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© 2021 г. Illumina, Inc. Все права защищены.

Все прочие товарные знаки являются собственностью компании «Иллюмина, Инк.» или их соответствующих владельцев. Сведения о конкретных товарных знаках см. в документе www.illumina.com/company/legal.html.

История редакций

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000009513 версия 07	Октябрь 2021 г.	Добавлен отсек для фильтра воздушного. В комплекте 3 запасных фильтра. Добавлен новый лоток для промывочного буфера в раздел «Выполнение промывания вручную». Обновлен раздел «Проверка системы», в который включены инструкции для учетных данных пользователя LRM. Обновлен раздел «Проверки прогонов секвенирования».
Документ № 1000000009513 версия 06	Август 2021 г.	Обновлен адрес Уполномоченного представителя ЕС.
Документ № 1000000009513 версия 05	Ноябрь 2020 г.	Обновлены требования к именам пользователей и паролям служебных учетных записей. Обновлена строка состояния с дополнительной информацией о цвете. Создан новый раздел «Настройки выходной папки по умолчанию». Добавлены примеры путей к выходным папкам. Добавлена диагностика ошибок сетевого хранилища. Добавлена информация об истечении срока действия пароля
Документ № 1000000009513 версия 04	Апрель 2020 г.	Обновлен адрес уполномоченного представителя ЕС. Обновлен адрес австралийского спонсора.
Документ № 1000000009513 версия 03	Март 2019 г.	Добавлена информация о наборе реагентов версии 2.5 (75 циклов).
Документ № 1000000009513 версия 02	Январь 2019 г.	Добавлена информация о наборе реагентов версии 2.5 (300 циклов). Обновлен перечень дополнительных ресурсов. Следует отметить, что инструкции к опции «Локальный менеджер прогона» (Local Run Manager) в данном руководстве предназначены для использования прибора в диагностическом режиме. Добавлены инструкции по переходу из исследовательского режима в диагностический режим на основании версии контрольного программного обеспечения NextSeq (NCS) на дисках исследовательского режима. Кнопка «Shut Down Options» (опции отключения) исправлена на кнопку «Reboot/Shutdown» (перезагрузка/отключение). Процедура выхода из Windows исправлена с добавлением стадии «Reboot/Shutdown» (перезагрузка/отключение).
Документ № 1000000009513 версия 01	Март 2018 г.	В раздел «Пользовательские настройки системы» (Customize System Settings) добавлена информация о службе упреждающего мониторинга компании «Иллюмина». Обновлены инструкции к разделу «Замена воздушного фильтра» (Replace Air Filter). Ссылки на базовые файлы вызова изменены с *.bcl на *.bcl.bgzf для уточнения, что файлы являются сжатыми. Обновлены инструкции по устранению ошибки проверки системы «Требования к программному обеспечению» (Required Software). Добавлена маркировка для Австралии в соответствии с нормативным регулированием.
Документ № 1000000009513 версия 00	Ноябрь 2017 г.	Первый выпуск.

Содержание

История редакций.....	iii
Глава 1 Общие сведения об устройстве	1
Характерные особенности секвенирования.....	1
Дополнительные ресурсы.....	1
Составные части прибора.....	1
Обзор набора реагентов	4
Общие сведения о наборах реагентов секвенирования	4
Поставляемые пользователем расходные материалы и оборудование.....	7
Глава 2 Программное обеспечение секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx	8
Общие сведения о программном обеспечении секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx	8
Общие сведения о программе Local Run Manager	10
Пароли пользователей.....	15
Глава 3 Начало	17
Запуск прибора	17
Пользовательские настройки системы.....	18
Опции перезагрузки и отключения	19
Глава 4 Секвенирование.....	21
Введение.....	21
Создание прогона в программном обеспечении Local Run Manager.	22
Подготовка картриджа с реагентами.....	22
Подготовка проточной ячейки	23
Подготовка библиотеки для секвенирования	23
Загрузка библиотек в картридж с реагентами	23
Настройка прогона секвенирования	24
Отслеживание хода прогона.....	28
Просмотр данных прогона и образца	29
Возможные состояния прогона.....	31
Повторное выполнение или остановка анализа	31
Автоматическое промывание после прогона.....	32
Глава 5 Техническое обслуживание	34
Введение.....	34
Выполнение промывания вручную	34
Замена фильтра воздушного.....	37

Приложение А Административные установки и задачи	A
Введение.....	A
Управление пользователями	A
Системные настройки	C
Настройки модуля	D
Журналы регистрации событий	E
Приложение В Устранение неисправностей	G
Введение	G
Проверка системы	G
Файлы устранения неисправностей.....	I
Устранение ошибок автоматической проверки.....	I
Резервуар для отходов заполнен	J
Сообщение об ошибке RAID.....	K
Ошибка сетевого хранилища.....	K
Установка настроек системы.....	K
Приложение С Анализ в реальном времени	M
Обзор анализа в реальном времени	M
Рабочий процесс анализа в реальном времени.....	N
Приложение D Файлы и папки выходных данных	Q
Выходные файлы секвенирования.....	Q
Структура папки выходных данных.....	S
Индекс	U
Техническая поддержка	X

Глава 1 Общие сведения об устройстве

Характерные особенности секвенирования	1
Дополнительные ресурсы	1
Составные части прибора	1
Обзор набора реагентов	4
Общие сведения о расходных материалах секвенирования	4
Поставляемые пользователем расходные материалы и оборудование	7

Характерные особенности секвенирования

- ▶ Высокопроизводительное секвенирование — секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет секвенировать библиотеки ДНК.
- ▶ Анализ в реальном времени (RTA; Real-Time Analysis) — выполняет обработку изображений и распознавание азотистых оснований. Дополнительную информацию см. в разделе *Обзор анализа в реальном времени* на странице 54.
- ▶ Возможность анализа данных в приборе — модули анализа для конкретного прогона в программе локального менеджера прогона, предназначенные для анализа данных прогона секвенирования, могут выполнять анализ данных прогона.
- ▶ Двухвариантная загрузка — секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx содержит отдельные жесткие диски, поддерживающие диагностический (Dx) и исследовательский (RUO) режимы.

Дополнительные ресурсы

Приведенная ниже документация доступна для загрузки с веб-сайта компании «Иллюмина» (Illumina).

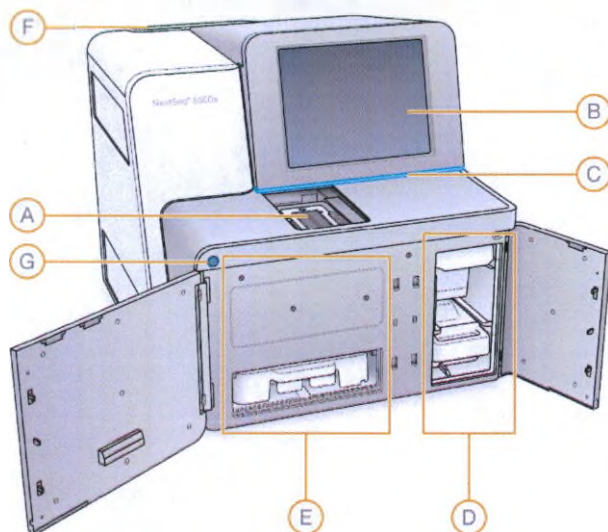
Ресурс	Описание
Руководство по установке секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (документ №1000000009869)	Представлены спецификации по лабораторным площадям, требованиям к электропитанию и учету условий окружающей среды.
Руководство по безопасности и нормативно-правовому соответствию секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (документ №1000000009868)	Представлены сведения о безопасности работы прибора, заявление о соответствии требованиям и маркировка прибора.
Руководство нормативно-правового соответствия считывающего устройства RFID (документ №10000000030332)	Представлены сведения о РЧИД-считывателе в приборе, сертификаты соответствия и обсуждение вопросов безопасности.
Руководство справочное по секвенатору нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx	Представлена краткая характеристика составных частей прибора, инструкция по использованию прибора, а также информация по техническому обслуживанию и устранению неисправностей.
Справочная информация по BaseSpace	Содержит информацию об использовании BaseSpace™ Sequence Hub и доступных вариантах анализа.

Посетите страницу поддержки прибора NextSeq 550Dx на сайте Illumina для доступа к документации, загрузки программного обеспечения, онлайн-обучения и часто задаваемых вопросов.

Составные части прибора

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx включает в себя монитор с сенсорным экраном и 4 модуля.

Рисунок 1. Составные части прибора



- A. **Отделение визуализации** — удерживает проточную ячейку в ходе прогона секвенирования.
- B. **Монитор с сенсорным экраном** — обеспечивает конфигурирование и настройку прибора с использованием рабочего интерфейса программного обеспечения.
- C. **Строка состояния** — Показывает состояние прибора: обработка данных (синий), требует внимания (оранжевый), готов к секвенированию (зеленый), инициализация (чередование синего и белого), еще не инициализирован (белый) или требует промывки в течение следующих 24 часов (желтый).
- D. **Отделение для буфера** — удерживает картридж с буфером и контейнер для использованных реагентов.
- E. **Отделение для реагентов** — удерживает картридж с реагентами.
- F. **Отделение для воздушного фильтра** — удерживает воздушный фильтр. Доступ к фильтру находится с задней стороны прибора.
- G. **Кнопка включения в сеть** — включает и отключает электропитание прибора и приборного компьютера.

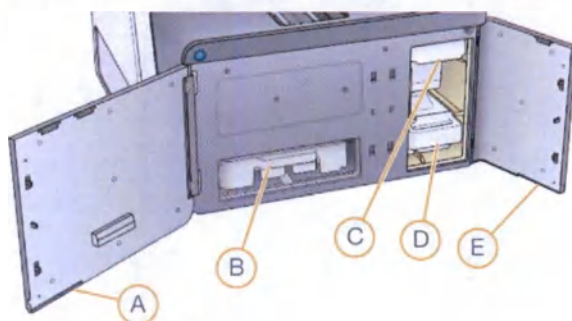
Отделение визуализации

В отделении визуализации размещен держатель, который включает в себя три установочных штыря для расположения проточной ячейки. После загрузки проточной ячейки дверца отделения визуализации закрывается автоматически, и компоненты перемещаются в надлежащее положение.

Отделения для реагентов и буфера

Для постановки прогона секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx необходим доступ к отделению для реагентов и буфера для загрузки расходных материалов и опорожнения контейнера для использованных реагентов.

Рисунок 2. Отделения для реагентов и буферов



- A. **Дверца отделения для реагентов** — запирает отделение для реагентов с помощью защелки на правой нижней панели дверцы. Отделение для реагентов удерживает картридж с реагентами.
- B. **Картридж с реагентами** — картридж с реагентами представляет собой предварительно наполненный расходный материал однократного применения.
- C. **Картридж с буфером** — картридж с буфером представляет собой предварительно наполненный расходный материал однократного применения.
- D. **Контейнер для использованных реагентов** — собирает использованные реагенты для удаления после каждого прогона.
- E. **Дверца отделения для буфера** — запирает отделение для буфера с помощью защелки на левой нижней панели дверцы.

Отделение для воздушного фильтра

Отделение для воздушного фильтра удерживает воздушный фильтр и расположено с задней стороны прибора. Воздушный фильтр заменяют раз в 90 дней. Информацию о замене фильтра см. в разделе *Замена воздушного фильтра на странице 39*.

Кнопка включения в сеть

Кнопка включения в сеть на передней стороне секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx включает электропитание прибора и приборного компьютера. В зависимости от состояния электропитания прибора кнопка включения в сеть выполняет описанные ниже действия. По умолчанию Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx запускается в диагностическом режиме.

Информацию о начальном подключении электропитания прибора см. в разделе *Запуск прибора на странице 17*.

Информацию о выключении прибора см. в разделе *Отключение прибора на странице 20*.

Состояние электропитания	Действие
Прибор не включен в сеть	Для включения прибора в сеть нажмите кнопку.
Прибор включен в сеть	Для отключения прибора от сети нажмите кнопку. На экране появляется диалоговое окно для подтверждения выключения прибора.
Прибор включен в сеть	Для быстрого выключения прибора и приборного компьютера нажмите и удерживайте кнопку включения в сеть в течение 10 секунд. Используйте этот способ выключения прибора только в том случае, если прибор не отвечает.

ПРИМЕЧАНИЕ

При выключении прибора во время прогона секвенирования происходит немедленная остановка прогона секвенирования. Остановка прогона секвенирования происходит окончательно. Наборы реагентов прогона нельзя использовать повторно, и данные секвенирования этого прогона не сохраняются.

Обзор набора реагентов

Общие сведения о наборах реагентов секвенирования

Наборы реагентов, необходимые для выполнения прогона секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, поставляются отдельно в наборе однократного применения. Каждый набор включает в себя проточную ячейку, картридж с реагентами, картридж с буфером и буфер для разведения библиотеки. Дополнительную информацию см. в разделах набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот (не применимо для Российской Федерации), набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот или набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот в инструкции по применению.

Для точного прослеживания работы и совместимости проточной ячейки картриджа с реагентами и картриджа с буфером используется радиочастотная идентификация (РЧИД).

ВНИМАНИЕ

Для набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот необходима система NOS 1.3 или более современные версии для того, чтобы прибор принял картридж с проточной ячейкой версии 2.5. Во избежание траты реагентов и/или образцов необходимо полностью обновить программное обеспечение перед подготовкой образцов и наборов реагентов.

ПРИМЕЧАНИЕ

Храните наборы реагентов для секвенирования в коробках до готовности к использованию.

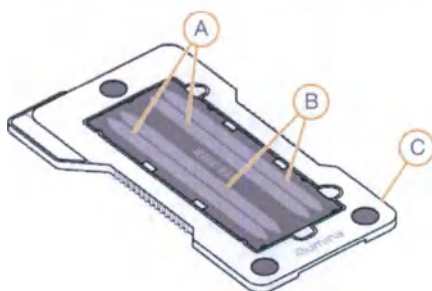
Требования к хранению наборов реагентов для секвенирования

Изделие (1 на один прогон)	Требование к хранению
Буфер для разведения библиотек	-25 °C - -15 °C
Картридж с реагентами	-25 °C - -15 °C
Картридж с буфером	15 °C - 30 °C
Картридж с проточной ячейкой	2 °C - 8 °C*

* Перевозку картриджа с проточной ячейкой NextSeq™ 550Dx v2.5 (NextSeq™ 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5) осуществляют при комнатной температуре.

Общие сведения о проточной ячейке

Рисунок 3. Картридж с проточной ячейкой



- A. Пара дорожек A - дорожки 1 и 3
- B. Пара дорожек B - дорожки 2 и 4
- C. Рамка картриджа с проточной ячейкой

Проточная ячейка представляет собой подложку, выполненную из материала на основе стекла, на которой образованы кластеры и проводится реакция секвенирования. Проточная ячейка вложена в картридж для проточной ячейки.

Проточная ячейка содержит 4 дорожки, которые визуализируются попарно.

- ▶ Визуализация дорожек 1 и 3, называемых парой дорожек А, осуществляется одновременно.
- ▶ Визуализация дорожек 2 и 4, называемых парой дорожек В, осуществляется после получения изображений пары дорожек А.

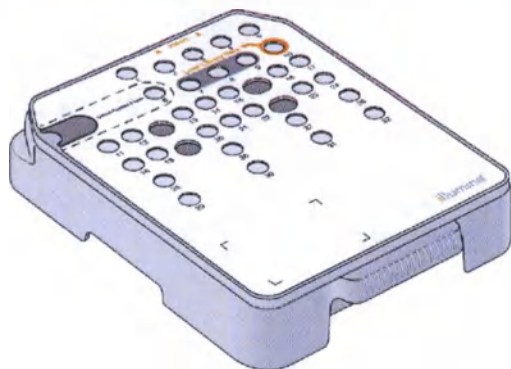
Хотя проточная ячейка содержит 4 дорожки, на одной проточной ячейке можно выполнить секвенирование только одной библиотеки или группы объединенных библиотек. Библиотеки загружают на картридж с реагентами из одного резервуара, и их перенос на все 4 дорожки проточной ячейки осуществляется автоматически.

Визуализация каждой дорожки осуществляется в виде изображений небольшой площади, называемых блоками. Дополнительную информацию см. в разделе *Блоки проточной ячейки на странице 57*.

Общие сведения о картридже с реагентами

Картридж с реагентами представляет собой реагенты однократного применения с РЧИД-прослеживанием и запаянными фольгой резервуарами, предварительно наполненными реагентами для кластеризации и секвенирования.

Рисунок 4. Картридж с реагентами



Картридж с реагентами включает в себя специальный резервуар для загрузки подготовленных библиотек. Как только начинается прогон, перенос библиотек из резервуара в проточную ячейку осуществляется автоматически.

Несколько запасных резервуаров оставлено для автоматической промывки после каждого прогона. Промывочный раствор перекачивается через всю систему из картриджа с буфером в запасные резервуары, а затем в контейнер для использованных реагентов.

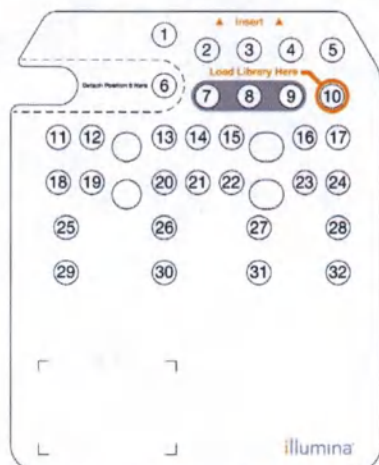


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может возникнуть при вдыхании, употреблении внутрь, контакте с кожей и контакте с глазами. Надевайте средства индивидуальной защиты, включая защиту глаз, перчатки и лабораторный халат, в соответствии с риском воздействия. Обращайтесь с использованными реагентами как с химическими отходами и утилизируйте их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и нормативными требованиями. Дополнительная информация о безопасности для здоровья и окружающей среды приводится в паспорте безопасности по ссылке support.illumina.com/sds.html.

Запасные резервуары

Рисунок 5. Пронумерованные резервуары



Позиция	Описание
7, 8 и 9	Запасные резервуары для праймеров по выбору пользователя
10	Загрузка библиотек

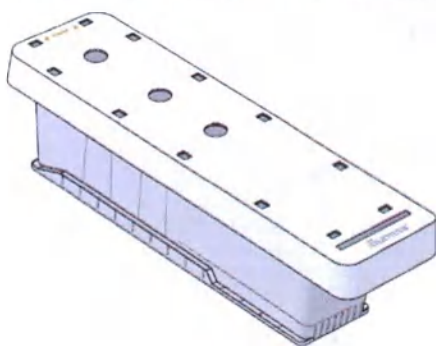
Съемный резервуар в позиции №6

Предварительно наполненный картридж с реагентами включает денатурирующий реагент в позиции 6, содержащий формамид. Для облегчения безопасной утилизации неиспользованных реагентов после прогона секвенирования резервуар в позиции 6 является съемным. Дополнительная информация приводится в разделе *Извлечение использованного резервуара в положении № 6 на странице 29*.

Общие сведения о картридже с буфером

Картридж с буфером представляет собой три резервуара, предварительно наполненных буферными растворами и промывочным раствором. Содержимое картриджа с буфером достаточно для проведения секвенирования в одной проточной ячейке.

Рисунок 6. Картридж с буфером



Общие сведения о буфере для разведения библиотеки

Буфер для разведения библиотеки находится в коробке с принадлежностями NextSeq™ 550Dx Accessory Box. Используйте буфер по мере необходимости для разведения библиотек в соответствии с инструкциями по разведению библиотек для достижения рекомендуемой плотности кластера.

Поставляемые пользователем расходные материалы и оборудование

В приборе NextSeq 550Dx используются следующие расходные материалы и оборудование. Для подготовки расходных материалов, секвенирования и технического обслуживания прибора используют следующие расходные материалы и оборудование. Для получения дополнительной информации см. руководство справочное по прибору NextSeq 550Dx.

Расходные материалы для проведения прогонов секвенирования

Расходные материалы	Поставщик	Назначение
Салфетки, пропитанные спиртом, 70% изопропиловый спирт или Этанол, 70%	VWR, № по каталогу 95041-714 (или эквивалент), любой поставщик лаборатории	Очистка проточной ячейки и общее назначение
Лабораторные салфетки из безворсовой ткани	VWR, № по каталогу 21905-026 (или эквивалент)	Очистка проточной ячейки и общее назначение

Расходные материалы для технического обслуживания прибора

Расходные материалы	Поставщик	Назначение
NaOCl, 5% (гипохлорит натрия)	«Сигма-Олдрич» (Sigma-Aldrich), № по каталогу 239305 (или эквивалент марки х. ч.)	Промывание прибора вручную после проведения прогона; раствор разбавляют до 0,12%
Твин-20	«Сигма-Олдрич» (Sigma-Aldrich), № по каталогу P7949	Промывание прибора с использованием опции промывания вручную; раствор разбавляют до 0,05%
Вода лабораторного класса чистоты	Любой поставщик лаборатории	Промывание прибора (вручную)
Фильтр воздушный	«Иллюмина» (Illumina), № по каталогу 20022240	Очистка воздуха, потребляемого прибором для охлаждения

Оборудование

Изделие	Источник
Морозильная камера, -25 °С - -15 °С, не требующая размораживания	Любой поставщик лаборатории
Холодильник, 2 °С - 8 °С	Любой поставщик лаборатории

Рекомендации для воды лабораторного класса чистоты

Для проведения процедур в приборе всегда используйте воду лабораторного класса чистоты или деионизированную воду. Ни в коем случае не используйте водопроводную воду. Используйте только следующие марки воды или их эквиваленты:

- ▶ Деионизированная вода
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Вода 18 MegaОм (MΩ)
- ▶ Вода Milli-Q
- ▶ Вода Super-Q
- ▶ Вода молекулярно-биологической степени очистки

Глава 2 Программное обеспечение секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

Общие сведения о программном обеспечении секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx.....	8
Общие сведения о программе локального менеджера прогона	10
Пароли пользователей.....	15

Общие сведения о программном обеспечении секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx

Описанное в этой главе программное обеспечение используется для конфигурирования, генерирования и анализа данных, полученных с помощью секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Программное обеспечение прибора включает в себя интегрированные приложения, которые выполняют анализ прогона секвенирования. Обновления программного обеспечения выполняют сотрудники компании «Иллюмина».

- ▶ **Программа локального менеджера прогона Local Run Manager** — интегрированное решение программного обеспечения для создания прогона и анализа результатов (дополнительного анализа). Это программное обеспечение также позволяет контролировать право доступа пользователей. Дополнительную информацию см. в разделе *Общие сведения о программе Local Run Manager* [странице 10](#).
- ▶ **Операционное программное обеспечение (NOS; NextSeq 550Dx Operating Software)** — осуществляет контроль работы прибора.
 - ▶ Это программное обеспечение предварительно установлено на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и обеспечивает выполнение работы прибора. NOS выполняет прогон секвенирования в соответствии с параметрами, указанными в программном модуле Local Run Manager.
 - ▶ До начала прогона секвенирования выберите прогон, созданный с помощью программы Local Run Manager. Управление всеми стадиями загрузки проточной ячейки и реагентов осуществляется посредством интерфейса программного обеспечения NOS.
 - ▶ В ходе проведения прогона программное обеспечение управляет состоянием проточной ячейки, распределением реагентов, контролем жидкостей, установкой температурного режима, регистрирует изображения кластеров на проточной ячейке и обеспечивает общее визуальное представление качественной статистики. Прогон можно проследить в NOS или в программе Local Run Manager.
- ▶ **Анализ в реальном времени (RTA)** — в ходе прогона RTA выполняет обработку изображений и распознавание азотистых оснований, также называемое основным анализом. Дополнительную информацию см. в разделе *Обзор анализа в реальном времени на странице 53*.

Требования к месту на диске

Емкость запоминающего устройства компьютера, объединенного с прибором, составляет приблизительно 1,5 ТБ.

Перед началом прогона программное обеспечение проверяет наличие свободного места на диске. Необходимое количество места на диске зависит от модуля анализа в программе Local Run Manager. Если места на диске недостаточно для проведения прогона, на экране появляется подсказка программного обеспечения. В этом сообщении указано, сколько места на диске необходимо для проведения прогона и сколько места необходимо освободить, чтобы можно было перейти к началу выполнения прогона. Если места на диске недостаточно, удалите в программе Local Run Manager папки с прогонами, для которых не требуется повторный анализ. Дополнительную информацию см. в разделе *Удаление папки прогона на странице 14*.

Пиктограммы состояния

Пиктограмма состояния в правом верхнем углу NOS сигнализирует о любом изменении условий в процессе настройки прогона или в ходе проведения прогона.

Пиктограмма состояния	Название состояния	Описание
	Состояние OK	Система работает нормально.
	Обработка	Система выполняет обработку данных.

Пиктограмма состояния	Название состояния	Описание
	Предупреждение	Появилось предупреждение. Предупреждения не прекращают прогон или требуют действий для продолжения.
	Ошибка	Произошла ошибка программного обеспечения. В случае ошибки для продолжения прогона требуются действия.
	Необходимо техническое обслуживание	Появилось уведомление, требующее внимания. Дополнительную информацию см. в сообщении.

Для уведомления об изменении состояния значок мигает. Выберите пиктограмму для просмотра описания состояния. Чтобы принять сообщение, выберите команду **Acknowledge (подтвердить)**, а для закрытия диалогового окна выберите команду **Close (закрыть)**.

ПРИМЕЧАНИЕ

После принятия сообщения пиктограмма перезагружается, а сообщение отображается серым цветом. Сообщение еще видно пользователю при выборе пиктограммы, но исчезает при перезапуске NOS.

Пиктограммы панели навигации

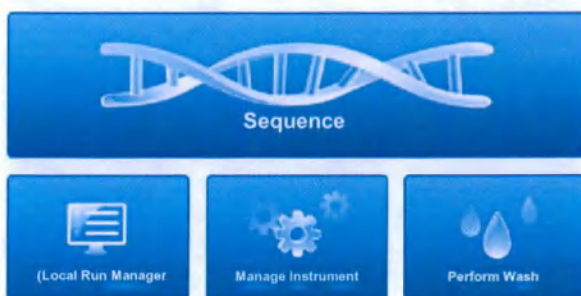
Пиктограмма свертывания NOS находится в правом верхнем углу рабочего интерфейса программного обеспечения и видна только пользователю с правами администратора.

Пиктограмма доступа	Название пиктограммы	Описание
	Выход из системы	Выберите для выхода из системы программного обеспечения.
	Свертывание NOS	Выберите, чтобы свернуть NOS для доступа к приложениям и папкам Windows. Эта пиктограмма появляется на экране только для пользователей с правами администратора.

Главная страница NOS

На главной странице NOS находятся следующие четыре пиктограммы.

Добро пожаловать в NextSeqDx



- **Sequence (Секвенирование)** — выберите начало прогона секвенирования из заданного перечня прогонов.

Документ № 1000000009513 в. 07

для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

- ▶ **Local Run Manager (Программа локального менеджера прогона)** — выберите запуск программы локального менеджера прогона для создания прогона, прослеживания состояния прогона, анализа данных секвенирования и просмотра результатов. Дополнительную информацию см. в разделе *Общие сведения о программе Local Run Manager* на странице 10.
- ▶ **Manage Instrument (Управление прибором)** — выберите для настроек контроля системы, перехода в исследовательский режим или закрытия программного обеспечения прибора.
- ▶ **Perform Wash (Выполнить промывание)** — выберите для выполнения быстрого промывания (Quick Wash) или промывания вручную после завершения прогона (Manual Post-Run Wash).

Общие сведения о программе Local Run Manager

Программа Local Run Manager представляет собой интегрированное решение программного обеспечения прибора для создания прогона, прослеживания состояния, анализа данных секвенирования и просмотра результатов.

Инструкции к программе локального менеджера прогона в данном руководстве применимы при работе прибора в диагностическом режиме. Сведения, приведенные в этом разделе, охватывают всю информацию о функционировании программы Local Run Manager. Некоторые характеристики могут быть применимы не ко всем модулям анализа. Конкретные характеристики модуля описаны в соответствующем руководстве к программе Local Run Manager.

Программа Local Run Manager характеризуется следующими особенностями:

- ▶ Проведение прогонов обслуживается программным обеспечением компьютера прибора и объединено с операционным программным обеспечением.
- ▶ Программа регистрирует образцы, предназначенные для секвенирования.
- ▶ Обеспечивает интерфейс настройки прогона для конкретного модуля анализа.
- ▶ Выполняет серию стадий анализа для конкретного выбранного модуля анализа.
- ▶ После завершения анализа показывает количественные результаты анализа в форме таблиц и графиков.

Просмотр программы Local Run Manager

Просмотр интерфейса программы Local Run Manager осуществляется в рамках NOS или посредством веб-браузера. Поддерживаемым веб-браузером является Chromium.

ПРИМЕЧАНИЕ

В случае использования не поддерживаемого браузера загрузите поддерживаемый браузер после получения сообщения-подсказки «Confirm Unsupported Browser» (подтвердить не поддерживаемый браузер). Для загрузки поддерживаемой версии Chromium выберите команду «**here**» (**на этом компьютере**).

Выполните просмотр на сетевом компьютере

Откройте веб-браузер Chromium на компьютере с доступом к той же сети, к которой подключен прибор, и соединитесь с ним по ссылке на IP-адрес или название прибора. Например, <http://myinstrument>.

Выполните просмотр на мониторе прибора

Для просмотра интерфейса программы Local Run Manager на мониторе прибора выберите одну из следующих опций:

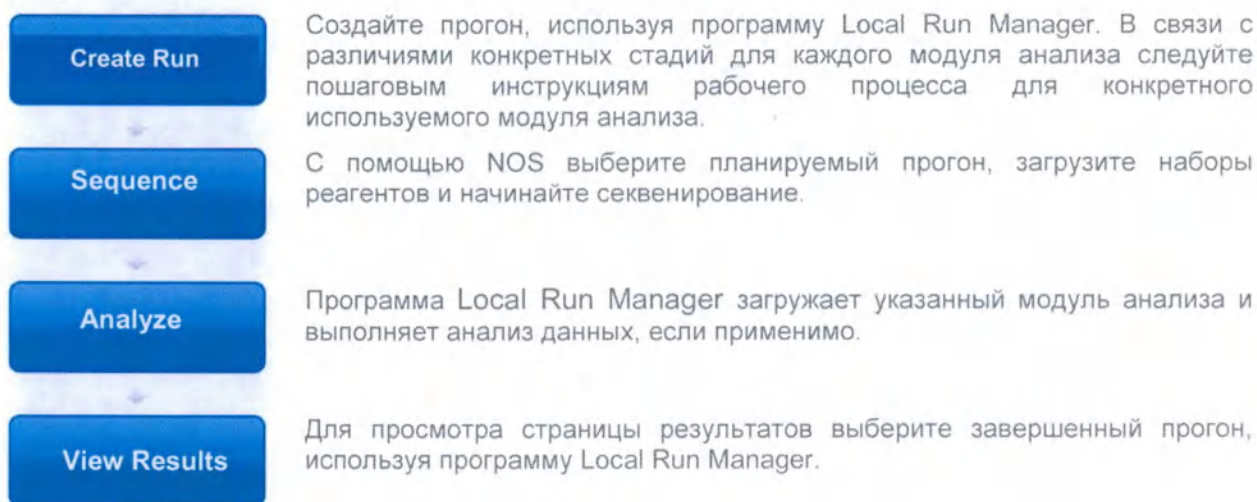
- ▶ Выберите **программу Local Run Manager** на главной странице NOS. Выберите X в правом верхнем углу для возврата в NOS.
- ▶ Выберите «Minimize NOS» (свернуть NOS), а затем откройте веб-браузер Chromium, находящийся в приборе, и введите **http://localhost** в адресной строке. Свертывать NOS могут только пользователи с правами администратора.

Секвенирование во время анализа

Компьютерные ресурсы системы секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx предназначены либо для секвенирования, либо для анализа. При необходимости в проведении нового прогона секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx до завершения дополнительного анализа предыдущего прогона секвенирования пользователь может выйти из программы дополнительного анализа в рамках Local Run Manager, а затем начать новый прогон секвенирования.

Для повторного запуска анализа, выполненного программой Local Run Manager, после завершения нового прогона секвенирования используйте свойство Requeue (Упорядочить заново) на интерфейсе программы Local Run Manager. С этого момента дополнительный анализ начнется сначала. См. *Повторное выполнение или остановка анализа на странице 33*.

Процесс работы программы Local Run Manager



Общие сведения о персональной панели управления

После загрузки программным обеспечением программы Local Run Manager открывается персональная панель управления. С помощью персональной панели управления можно выполнять следующие задачи:

- ▶ Проследить состояние секвенирования и анализа
- ▶ Сортировать и фильтровать прогоны
- ▶ Создавать и редактировать прогоны
- ▶ Прекращать или возобновлять анализ данных
- ▶ Просматривать результаты анализа
- ▶ Скрывать прогоны
- ▶ Закреплять прогоны
- ▶ Управлять папкой прогонов

На персональной панели управления находится перечень всех прогонов, проведенных в приборе, 10 прогонов на страницу. Для перелистывания страниц используйте стрелки навигации внизу страницы.

Каждый прогон в перечне включает в себя наименование прогона, модуль анализа, состояние прогона и дату последнего изменения прогона. Для сортировки прогонов выберите колонку наименований.

- ▶ **Run Name/ID (Наименование/идентификатор прогона)** - отображает перечень присвоенных наименований прогонов и ссылки на страницу результатов прогона. После завершения анализа в колонку наименований прогонов добавляются наименование папки анализа.
- ▶ **Module (Модуль)** - отображает перечень модулей анализа, назначенных для каждого прогона.
- ▶ **Состояние (Status)** - отображает перечень состояний прогонов и включает в себя

строку изменений состояния. Дополнительную информацию см. в разделе *Возможные состояния прогона на странице 33*.

- **Последнее изменение (Last Modified)** - отображает перечень дат и времени последнего изменения проведения прогона или его анализа. По умолчанию в этой колонке выделена страница «Active Runs» (Активные прогоны).

Пиктограммы программы Local Run Manager

Для выполнения различных задач в программе Local Run Manager используются следующие пиктограммы. Обратите внимание, что в зависимости от размера экрана некоторые пиктограммы сжаты под пиктограммой  More Options (Дополнительные параметры).

Пиктограмма	Название	Описание
	Копировать в буфер обмена	Копирует поле в буфер обмена компьютера.
	Удалить папку прогона	Удаляет данные из прогона, чтобы очистить место на жестком диске.
	Редактировать	Позволяет редактировать параметры прогона перед секвенированием.
	Редактирование расположения папки выходных данных	Позволяет редактировать путь доступа к папке прогона.
	Сменить пользователя	Позволяет осуществлять смену пользователей и паролей.
	Экспортировать	Команда для экспорта элементов.
	Скрыть прогон	Перемещает прогон со страницы активных прогонов на страницу скрытых прогонов. Позволяет просмотреть скрытые прогоны с помощью меню в правом нижнем углу страницы активных прогонов.
	Заблокирован	Означает, что прогон выполняется в данный момент, или другой пользователь проводит редактирование прогона в другом сеансе браузера.
	Дополнительные параметры	Открывает доступные для ввода параметры на панели управления. В зависимости от размера экрана, точки могут выглядеть более круглыми.
	Закрепить	Закрепляет прогон на странице активных прогонов для предотвращения удаления папки прогона.
	Восстановить прогон	Перемещает прогон со страницы скрытых прогонов на страницу активных прогонов.
	Связать повторно папку прогона	Позволяет повторно связать прогон после восстановления папки удаленного прогона. Далее можно проводить повторный анализ прогона.
	Повторный анализ	Запускает повторный анализ выбранного прогона.
	Прогон закреплен	Показывает, что прогон был закреплен на странице активных прогонов.
	Удаленный прогон	Показывает удаленный прогон.
	Сохраняет расположение папки выходных данных	Сохраняет изменения пути доступа к папке выходных данных прогона.
	Поиск	Открывает поле поиска для поиска названий прогонов и идентификаторов образцов. В зависимости от размера экрана пиктограмма может быть сжата под пиктограммой дополнительных параметров.
	Показать фильтры	Показывает фильтры.
	Остановка анализа	Останавливает анализ с помощью модуля программы Local Run Manager.
	Открепить	Открепляет прогон.
	Пользователь	Открывает меню учетной записи пользователя.

Обнаруженные
предупреждения

Для получения информации о предупреждениях см. текст предупреждения.

Страница активных прогонов

Открывается панель управления, отображая страницу активных прогонов. В верхней части страницы активных прогонов в резюме активных прогонов представлено количество прогонов в каждой из следующих категорий состояния прогона. Чтобы применить фильтры к активным прогонам в соответствии с состоянием, щелкните по номеру.

- ▶ **Ready (Готов)** - указывает на то, что прогон готов к секвенированию.
- ▶ **In Progress (Выполняется)** - указывает, что прогон находится в процессе секвенирования или анализа данных.
- ▶ **Stopped or Unsuccessful (Остановлен или выполнен неудачно)** - указывает, что анализ был остановлен вручную или что анализ не удалось выполнить.
- ▶ **Complete (Завершен)** - указывает, что анализ был успешно завершен.
- ▶ **Total (Итого)** - общее количество прогонов на странице активных прогонов.

Применить фильтры к прогонам

1 Чтобы применить фильтры, на странице активных прогонов выберите категорию состояния прогона в резюме активных прогонов, как указано ниже.

- ▶ **Ready (Готов)** - фильтрация списка, показывающая только готовые к секвенированию прогоны
- ▶ **In Progress (Выполняется)** - фильтрация списка, показывающая только прогоны, которые выполняются в данный момент.
- ▶ **Stopped or Unsuccessful (Остановлен или выполнен неудачно)** - фильтрация списка, показывающая только прогоны, которые были остановлены или выполнены неудачно.
- ▶ **Complete (Завершен)** - фильтрация списка, показывающая только завершенные прогоны.
- ▶ **Total (Итого)** - отменяет фильтры и показывает все активные прогоны.

Скрыть и восстановить прогоны

1. На странице активных прогонов, выберите пиктограмму «More Options» (дополнительные параметры) , а затем выберите **«Hide» (скрыть)**.
2. Когда будет предложено подтвердить перемещение, выберите «Hide» (скрыть). Прогон перемещен на страницу скрытых прогонов.
3. Чтобы отобразить страницу скрытых прогонов, выберите стрелку раскрывающегося списка **«Active Runs»** (Активные прогоны) и затем выберите **«Hidden Runs»** (скрытые прогоны).
4. На странице скрытых прогонов выберите пиктограмму **«Restore»**  (восстановить).
5. Когда будет предложено подтвердить перемещение, выберите **«Restore»** (восстановить). Цикл восстановлен на странице активных прогонов.
6. Чтобы отобразить страницу активных прогонов, выберите стрелку раскрывающегося списка **«Hidden Runs»** (скрытые прогоны) и затем выберите **«Active Runs»** (активные прогоны).

Поиск прогонов или образцов

1. В навигационной строке панели управления выберите пиктограмму **«Search»**  (поиск).
2. В поле поиска введите название прогона или идентификатор образца. По мере ввода будет появляться список возможных совпадений, которые помогут вам в поиске.
3. Выберите совпадение из списка или нажмите **«Enter»** (ввести).

- ▶ Если вы осуществляли поиск по названию прогона, откроется вкладка обзора прогона.
 - ▶ Если вы осуществляли поиск по идентификатору образца, откроется вкладка образцов и результатов.
- Для получения дополнительной информации см. *Просмотр данных прогона и образца на странице 31*.

Редактирование прогона

1. На странице активных прогонов, выберите пиктограмму «More Options» (дополнительные параметры) возле названия прогона, который вы хотите редактировать.
 2. Выберите  «Edit» (редактировать).
 3. Когда будет предложено подтвердить действие, выберите «Continue» (продолжить).
 4. Проведите редактирование параметров прогона по мере необходимости.
 5. После завершения выберите «Save Run» (сохранить прогон).
- Дата последнего изменения прогона обновляется на странице активных прогонов.

Закрепление прогона

Закрепленные прогоны невозможно удалить или скрыть. Прогон невозможно закрепить, если он скрыт или его папка прогона была удалена.

1. На странице активных прогонов, нажмите пиктограмму «More Options» (дополнительные параметры) возле названия прогона.
 2. Выберите  «Pin» (закрепить).
- Удалить папку прогона, а также скрыть прогон невозможно. Закрепление отменяется при нажатии  «Unpin» (открепить).

Удаление папки прогона

Вы можете вручную удалить папки прогонов, чтобы освободить место для хранения. Прогон не может быть закреплен, если он находится в одном из следующих состояний:

- ▶ Секвенирование завершено
- ▶ Первичный анализ завершен
- ▶ Первичный анализ выполнен неудачно
- ▶ Ошибка секвенирования
- ▶ Ошибка анализа
- ▶ Анализ завершен
- ▶ Секвенирование остановлено
- ▶ Анализ остановлен

1. На странице активных прогонов, нажмите пиктограмму «More Options» (дополнительные параметры) возле названия прогона, который вы хотите удалить.
2. Выберите  «Delete Run Folder» (удалить папку прогона).

Параметр «Delete Run Folder» (удалить папку прогона) отменяется параметром  «Relink Run Folder» (связать повторно папку прогона). На прогоне появляется пиктограмма  «Run Deleted» (прогон удален).

Связать повторно папку прогона

Повторно связать удаленные папки прогона может только администратор.

1. Скопируйте папку прогона обратно в исходное местоположение.
- Если прогон не сохраняется в исходном местоположении, программное обеспечение

- отображает сообщение об ошибке после попытки восстановления.
2. Наведите курсор на пиктограмму «**More Options**»  (дополнительные параметры) возле названия прогона.
 3. Выберите  «**Relink Run Folder**» (связать повторно папку прогона).
 4. Подтвердите, чтобы продолжить и восстановить прогон.

Прогон восстановлен в том состоянии, в котором он находился до удаления папки прогона.

Пароли пользователей

Чтобы получить доступ к интерфейсу программы локального менеджера прогона (Local Run Manager), вам необходимы действительные имя пользователя и пароль для входа в систему. Учетные данные пользователя может присваивать только администратор.

ПРИМЕЧАНИЕ

Учетные данные пользователей относятся к конкретному инструменту. Пароли пользователей не являются универсальными для разных инструментов.

При приближении даты истечения срока действия вашего пароля, в верхней части интерфейса появляется сообщение, напоминающее вам о необходимости повторного установления пароля.

Моя учетная запись

Со страницы «**My Account**» (моя учетная запись) Вы можете просмотреть свое имя пользователя, присвоенную роль, разрешения и изменить свой пароль.

После первого входа в систему Вы можете в любой момент изменить существующий пароль в окне своей учетной записи.

Ваш текущий пароль зашифрован. Поэтому Вам необходимо его знать, чтобы изменить на новый пароль. Восстановление забытого пароля проводится с помощью системного администратора или администратора.

Состояние пароля

Ниже приведены возможные состояния пароля:

- ▶ **Временный пароль** - когда пользователь с правами администратора создает учетную запись нового пользователя, он назначает временный пароль.
- ▶ **Пароль пользователя** - при первом доступе новому пользователю предлагается сменить временный пароль с экрана входа на назначенный пользователем пароль.
- ▶ **Забытый пароль** - если пользователь не помнит пароль, пользователь-администратор может повторно назначить временный пароль, который можно изменить при следующем доступе.
- ▶ **Использованный пароль** - ни один пользователь не может повторно использовать пароль более пяти циклов паролей.
- ▶ **Блокировка пользователя** - количество попыток входа в систему с использованием неверного пароля настраивается администратором. При превышении пользователем количества разрешенных попыток, учетная запись пользователя блокируется. Только администратор может разблокировать учетную запись или назначить временный пароль.

Изменение пароля

1. В строке навигации в верхней части интерфейса выберите пиктограмму «**User**»  (пользователь) рядом с вашим именем.

ПРИМЕЧАНИЕ

В зависимости от размера экрана, на котором просматривается программное обеспечение, пиктограмма «**User**» (пользователь)  может быть сжата под верхним левым пиктограммой «**More Options**» (дополнительные параметры) .

2. В раскрывающемся списке выберите «**My Account**» (моя учетная запись).

3. Выберите пиктограмму «**Edit**»  (редактировать) в разделе пароля.
4. В поле «**Old Password**» (старый пароль) введите ваш старый пароль.
5. В поле «**New Password**» (новый пароль) введите новый пароль.
6. В поле «**Confirm New Password**» (подтвердить новый пароль) введите повторно Ваш новый пароль.
7. Выберите «**Save**» (сохранить).

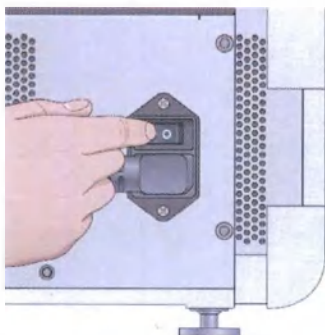
Глава 3 Начало

Запуск прибора	17
Пользовательские настройки системы	18
Опции перезагрузки и отключения	19

Запуск прибора

Установите переключатель питания в положение «I» (вкл.).

Рисунок 7. Переключатель питания, расположенный на задней панели прибора



1. Нажмите на кнопку питания над отсеком для реагентов. Кнопка питания включает питание прибора и запускает встроенный компьютер и программное обеспечение.

Рисунок 8. Кнопка питания, расположенная на передней панели прибора



2. Дождитесь завершения загрузки операционной системы. Операционное программное обеспечение NextSeq 550Dx (NOS) запускается и инициализирует систему автоматически. После завершения этапа инициализации открывается домашний экран.
3. Введите имя пользователя и пароль для местного диспетчера прогонов. Информация о паролях приводится в разделе *Пароли пользователей на странице 15*. Информация по настройке учетной записи в местном диспетчере прогонов приводится в разделе *Введение на странице 41*.
4. Выберите «Login» (Вход). Откроется главный экран с пиктограммами «Sequence» (секвенирование), «Local Run Manager» (местный диспетчер прогонов), «Manage Instrument» (управление прибором) и «Perform Wash» (выполнить промывку).

Индикаторы режима прибора

Режим по умолчанию секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx - диагностический режим. Следующее на экране NOS обозначает режим прибора.

Режим	Главный экран	Цветная панель	Ориентация пиктограммы состояния
Диагностический режим	Добро пожаловать в NextSeqDx	Синий	Горизонтально
Исследовательский режим	Добро пожаловать в NextSeq	Оранжевый	Вертикально

Пользовательские настройки системы

Операционное программное обеспечение включает настраиваемые установки системы для определения прибора, предпочтений ввода, настроек звука и расположения папки выходных данных. Для изменения настроек конфигурации сети, см. *Установка настроек системы на странице 51*.

Возможности настройки:

- ▶ Настройка определения прибора (символ и название)
- ▶ Установка опций ввода и индикатора звука
- ▶ Установка опций настроек прогона
- ▶ Опции отключения
- ▶ Настройка запуска прибора и проверки перед прогоном
- ▶ Выбор отправки данных о работе прибора в компанию «Иллюмина» (Illumina)
- ▶ Определение папки выходных данных прогона

Настройка символа и названия прибора

1. На главном экране выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«System Customization»** (пользовательские настройки системы).
3. Чтобы присвоить изображение желаемого символа для вашего прибора, выберите **«Browse»** (поиск) и найдите изображение.
4. В поле названия введите желаемое название прибора.
5. Выберите **«Save»** (сохранить), чтобы сохранить изменения и перейти на экран. Изображение и название появятся в верхнем левом углу каждого экрана.

Установка опций клавиатуры и индикатора звука

1. На главном экране выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«System Customization»** (пользовательские настройки системы).
3. Выберите кнопку-флажок **«Use on-screen keyboard»** (использовать экранную клавиатуру) для активации экранной клавиатуры для ввода на приборе.
4. Выберите кнопку-флажок **«Play audio»** (проигрывание звуков) для включения звуковых оповещений для следующих событий.
 - ▶ При инициализации прибора
 - ▶ При начале прогона
 - ▶ При возникновении определенных ошибок
 - ▶ Если требуется действие пользователя
 - ▶ При завершении прогона
5. Выберите **«Save»** (сохранить), чтобы сохранить изменения и перейти на экран.

Установка запуска прогона и данных о работе прибора

1. На главном экране выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«System Customization»** (Пользовательские настройки системы).
3. [Дополнительно] Выберите кнопку-флажок **«Automatically start run after pre-run check»** (автоматический запуск прогона после проверки перед прогоном) для автоматического начала секвенирования после успешной проверки перед прогоном.
4. Выберите **«Send Instrument Performance Data to Illumina»** (отправлять данные о работе прибора в компанию «Иллюмина» (Illumina)) для включения режима проактивного мониторинга Illumina. Название установки в интерфейсе программного обеспечения может отличаться от названия в данном руководстве, в зависимости от версии, используемой NOS.

Если данная установка включена, данные о работе прибора направляются в компанию «Иллюмина» (Illumina). Эти данные позволяют компании «Иллюмина» (Illumina) проще выявлять неисправности и потенциальные ошибки, что позволяет осуществлять упреждающее обслуживание и повышать время бесперебойной работы прибора.

Этот режим:

- ▶ Не отправляет данные секвенирования
 - ▶ Требуется, чтобы прибор был подключен к сети с доступом в Интернет
 - ▶ Отключена по умолчанию. Для выбора этого режима, включите отправку данных о работе прибора в компанию «Иллюмина» (Illumina).
5. Выберите **«Save»** (сохранить), чтобы сохранить настройки и вернуться на экран управления прибором.

Установка папки выходных данных по умолчанию

Как учетная запись Windows в Local Run Manager, так и учетная запись Windows в операционной системе прибора требуют разрешения на чтение и запись в выходную папку. Чтобы проверить разрешения, обратитесь к своему ИТ-администратору. Чтобы настроить учетную запись Windows в диспетчере локальных запусков, см. раздел *Настройка учетных записей системных служб на странице 44*.

- 1 На главном экране выберите **Управление инструментом** (Manage Instrument).
- 2 Выберите **Настройка системы** (System Customization).
- 3 Выберите **Обзор** (Browse), чтобы перейти к расположению папки.
- 4 В папке выходных данных введите полный путь к файлу по Универсальной конвенции именования (UNC).
 - ▶ Путь UNC включает два обратных слеша, имя сервера и имя каталога, но не букву для сопоставленного сетевого диска.
 - ▶ Пути к папке выходных данных, находящиеся на одном уровне, требуют обратного слеша в конце (например, \\servername\directory1\).
 - ▶ Пути к папке выходных данных, состоящие из двух или более уровней, не требуют обратного слеша в конце (например, \\servername\directory1\directory2).
 - ▶ Пути к сопоставленному сетевому диску вызывают ошибки. Не используйте их.
- 5 Выберите **«Save»** (сохранить), чтобы сохранить настройки и вернуться на экран управления прибором.

Опции перезагрузки и отключения

При нажатии на кнопку **«Reboot/Shutdown»** осуществляется доступ к следующим функциям:

- ▶ Перезагрузка в режим RUO - прибор открывается в исследовательском режиме.
- ▶ Перезагрузка - прибор открывается в диагностическом режиме.
- ▶ Перезагрузка в режим Dx из режима RUO - прибор открывается в диагностическом режиме.

- ▶ Отключение - при повторном включении прибор открывается в диагностическом режиме.
- ▶ Выход в Windows - в зависимости от допуска, можно закрыть NOS и выйти в Windows.

Перезагрузка в режим RUO

Используйте команду перезагрузки в режим RUO для изменения программного обеспечения системы на исследовательский режим. Администратор предоставляет пользователю доступ для доступа к данной функции.

1. Выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«Reboot/Shut Down»** (перезагрузка/отключение).
3. Выберите **«Reboot to RUO»** (перезагрузка в режим RUO).

Перезагрузка в диагностический режим

Используйте команду **«Restart»** (перезагрузка) для безопасного отключения прибора и перезагрузки в диагностический режим.

Диагностический режим - режим загрузки по умолчанию.

1. Выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«Reboot/Shut Down»** (перезагрузка/отключение).
3. Выберите **«Restart»** (перезагрузка).

Возврат в диагностический режим из исследовательского режима

Команда перехода из исследовательского режима в диагностический режим отличается в зависимости от версии контрольного программного обеспечения NextSeq (NCS) на дисках исследовательского режима.

1. В исследовательском режиме выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите один из следующих вариантов для возврата в диагностический режим.
 - ▶ NCS в. 3.0 — Выберите **«Shutdown Options»** (опции отключения) и затем **«Restart»** (перезагрузка).
 - ▶ NCS в. 3.0 — Выберите **«Shutdown Options»** (опции отключения) и затем **«Reboot to Dx»** (перезагрузка в диагностический режим).

Отключение прибора

1. Выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«Reboot/Shut Down»** (перезагрузка/отключение).
3. Выберите **«Shutdown»** (отключение).

Команда отключения безопасно отключает программное обеспечение и выключает питание прибора. Подождите не менее 60 секунд перед повторным включением прибора.

ПРИМЕЧАНИЕ

По умолчанию прибор при включении загружается в диагностическом режиме.

ВНИМАНИЕ

Не перемещайте прибор. Неправильное перемещение прибора может повлиять на взаимное расположение оптических частей и нарушить целостность данных. Если нужно переместить прибор, обратитесь к вашему представителю компании «Иллюмина» (Illumina).

Выход в Windows

Команда **«Exit to Windows»** (выход в Windows) предоставляет доступ к операционной системе прибора и любой папке на компьютере прибора. Команда безопасно отключает программное обеспечение и осуществляет выход к Windows. Выход в Windows может осуществить только администратор.

1. Выберите **«Manage Instrument»** (Управление прибором).
2. Выберите **«Reboot/Shut Down»** (перезагрузка/отключение).
3. Выберите **«Exit to Windows»** (выход в Windows).

Глава 4 Секвенирование

Введение	21
Создание прогона в программном обеспечении Local Run Manager.	22
Подготовка картриджа с реагентами	22
Подготовка проточной ячейки	23
Подготовка библиотеки для секвенирования.....	23
Загрузка библиотек в картридж с реагентами.....	23
Настройка прогона секвенирования	24
Отслеживание хода прогона	29
Просмотр данных прогона и образца	30
Возможные состояния прогона	31
Повторное выполнение или остановка анализа	32
Автоматическое промывание после прогона	32

Введение

Для выполнения прогона секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, подготовьте картридж с реагентами и проточную ячейку и затем следуйте указаниям программного обеспечения для настройки и запуска прогона. Создание кластера и секвенирование выполняются в приборе. После прогона промывание прибора начинается автоматически с использованием компонентов, уже загруженных в прибор.

Создание кластера

При создании кластера одиночные молекулы ДНК связываются с поверхностью проточной ячейки и затем амплифицируются с формированием кластеров.

Секвенирование

Изображения кластеров выполняются с использованием двухканальных комбинаций химии и фильтров секвенирования, специфичных для каждого из нуклеотидов с флуоресцентной меткой. После завершения получения изображения клетки на проточной ячейке, выполняется съемка следующей клетки. Данный процесс повторяется для каждого цикла секвенирования. После анализа изображения программное обеспечение выполняет распознавание оснований, фильтрацию и оценку качества.

Анализ

В ходе прогона операционное программное обеспечение автоматически переносит файлы распознавания оснований (BCL) в указанное расположение выходных данных для вторичного анализа.

Длительность прогона секвенирования

Длительность прогона секвенирования зависит от количества выполняемых циклов. Максимальная длина прогона - прогон парноконцевого чтения по 150 циклов в каждом считывании (2×150), плюс до 8 с 2 индексными считываниями в каждом.

Количество циклов в считывании

В прогоне секвенирования количество выполняемых циклов в считывании на 1 цикл больше, чем количество анализируемых циклов. Например, прогон парноконцевого чтения 150 циклов выполняет 151 цикл (2×151), в общей сложности 302 цикла. В конце прогона анализируется 2×150 циклов. Дополнительный цикл требуется для фазирования и расчетов перед фазированием.

Рабочий процесс секвенирования

Создать

Создайте прогон в программном модуле Local Run Manager. См. руководство по протоколу анализа для вашего конкретного модуля.



Подготовьте новый картридж с реагентами: разморозьте и осмотрите его. Подготовьте новую проточную ячейку: доведите ее до комнатной температуры, разверните и осмотрите.



Денатурирование и разведение библиотек. См. инструкцию в листовке-вкладыше по подготовке библиотеки.



Загрузите разведение библиотеки в резервуар №10 картриджа библиотеки.



На главном экране NOS прибора, выберите «**Sequence**» (секвенирование), ваш код прогона, и начните этапы настройки прогона. Выберите «**Run**» (прогон).



Загрузите проточную ячейку.



Извлеките и перезагрузите израсходованный контейнер с реагентами. Загрузите картридж с буфером и картридж с реагентами.



Просмотрите результаты проверки перед прогоном. Выберите «**Start**» (запуск). (Не требуется при настроенном автоматическом запуске).



Отслеживайте прогон в операционном программном обеспечении или на подключенном к сети компьютере с Local Run Manager.



Промывка прибора начинается автоматически после завершения секвенирования.

Создание прогона в программном обеспечении Local Run Manager.

См. руководство по модулю Local Run Manager, где приводятся конкретные указания по созданию прогона. Хотя процесс настройки прогона в Local Run Manager отличается в зависимости от конкретного используемого модуля протокола анализа, он включает следующие этапы.

- ▶ Выберите «**Create Run**» (создать прогон) в местном диспетчере прогонов на панели управления и выберите модуль анализа.
- ▶ На странице «**Create Run**» (создать прогон), введите название прогона, введите образцы для прогона и/или импортируйте списки.

Подготовка картриджа с реагентами

Обязательно тщательно соблюдайте указания по подготовке картриджа с реагентами для успешного секвенирования.

1. Извлеките картридж с реагентами из хранения при температуре от -25°C до -15°C.
2. Выберите один из следующих методов размораживания реагентов. Не погружайте картридж полностью. После размораживания картриджа высушите его, прежде чем приступить к следующему этапу.

Температура	Время размораживания	Предел стабильности
Водяная баня, от 15°C до 30°C	60 минут	Не более 6 часов
2 °C - 8 °C	7 часов	Не более 5 суток

ПРИМЕЧАНИЕ

При размораживании нескольких картриджей в одной и той же водяной бане, для размораживания требуется дополнительное время.

3. Переверните картридж пять раз для перемешивания реагентов.
4. Осмотрите дно картриджа и убедитесь, что реагенты разморожены, и в них отсутствуют частицы. Убедитесь в разморозке реагентов в положениях 29, 30, 31 и 32, так как они наиболее объемные и требуют наибольшего времени для размораживания.
5. Осторожно постучите по рабочей поверхности для снижения количества пузырьков. Для наилучших результатов, сразу же приступайте к загрузке образца и настройке прогона.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может возникнуть при вдыхании, употреблении внутрь, контакте с кожей и контакте с глазами. Надевайте средства индивидуальной защиты, включая защиту глаз, перчатки и лабораторный халат, в соответствии с риском контакта. Обращайтесь с использованными реагентами как с химическими отходами и утилизируйте их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и требованиями. Дополнительная информация по окружающей среде, здоровью и безопасности приводится в паспорте безопасности по ссылке support.illumina.com/sds.html.

Подготовка проточной ячейки

1. Извлеките новую коробку с проточной ячейкой из хранения при температуре от 2°C до 8°C.
2. Извлеките упаковку из фольги из коробки и оставьте ее при комнатной температуре на 30 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ

При неповрежденной упаковке из фольги проточная ячейка может оставаться при комнатной температуре в течение до 12 часов. Избегайте многократного охлаждения и нагревания проточной ячейки.

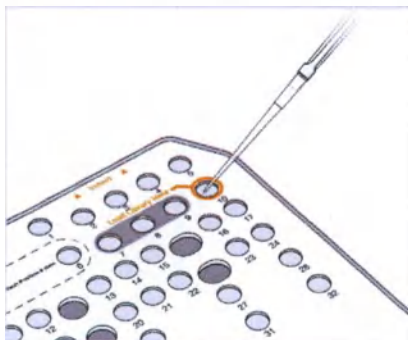
Подготовка библиотеки для секвенирования

Денатурируйте и разведите ваши библиотеки до загрузочного объема 1,3 мл. На практике загрузочная концентрация может различаться в зависимости от приготовления библиотеки и методов количественного определения. Разведение библиотек образцов зависит от сложности пулов олигонуклеотидов. Указания по приготовлению библиотек образцов для секвенирования, включая разведение и объединение библиотеки, приводится в разделе инструкции по применению для соответствующего набора приготовления библиотеки. На секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, требуется оптимизация плотности кластеров.

Загрузка библиотек в картридж с реагентами

1. Очистите прокладку из фольги на емкости №10, обозначенной «Load Library Here» (для загрузки библиотеки) с использованием безворсовой ткани.
2. Проткните прокладку чистым наконечником для пипетки на 1 мл.
3. Загрузите 1,3 мл подготовленных библиотек в емкость №10, обозначенную «Load Library Here» (для загрузки библиотеки). Не прикасайтесь к прокладке из фольги при загрузке библиотек.

Рисунок 9. Загрузка библиотек



Настройка прогона секвенирования

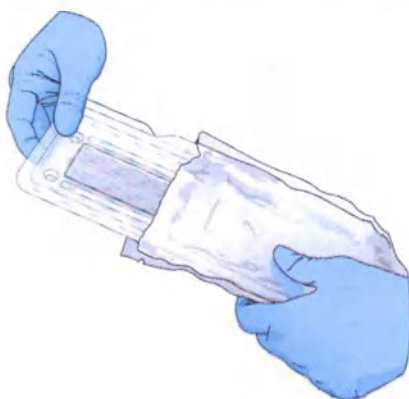
Выберите Run (прогон)

1. На главном экране выберите «**Sequence**» (секвенирование).
2. Выберите прогон из списка.
Информация по созданию прогона секвенирования приводится в разделе *Рабочий процесс Local Run Manager* на странице 11.
Дверца отсека визуализации открывается, извлекая наборы реагентов предыдущего прогона, и открывает ряд экранов настройки прогона. Небольшая задержка нормальна.
3. Выберите «**Next**» (далее).

Загрузка проточной ячейки

1. Извлеките использованную проточную ячейку предыдущего прогона.
2. Выньте проточную ячейку из упаковки из фольги.

Рисунок 10. Извлечение из упаковки из фольги



3. Откройте прозрачный пластиковый створчатый контейнер и извлеките проточную ячейку.

Рисунок 11. Извлечение из створчатого контейнера



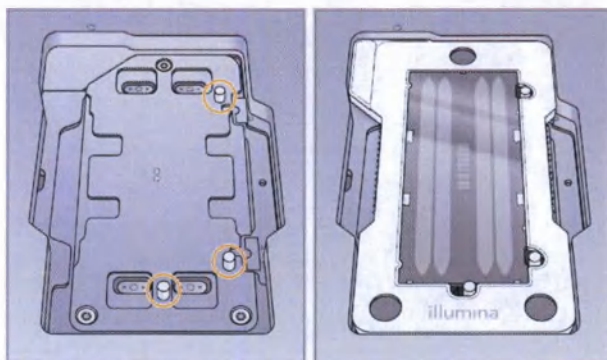
- Очистите стеклянную поверхность проточной ячейки безворсовой спиртовой салфеткой. Высушите стекло безворсовой лабораторной тканью.

ПРИМЕЧАНИЕ

Убедитесь в чистоте стеклянной поверхности проточной ячейки. При необходимости повторите этап очистки.

- Совместите проточную ячейку с направляющими штифтами и поместите проточную ячейку на платформу.

Рисунок 12. Загрузка проточной ячейки



- Выберите «Load» (загрузка).
Дверца автоматически закрывается, на экране появляется код проточной ячейки, и выполняется проверка датчиков.

ПРИМЕЧАНИЕ

Не прикасайтесь к дверце проточной ячейки во время закрытия во избежание защемления.

- Выберите «Next» (далее).

Опорожнение контейнера с израсходованными реагентами

- Откройте дверцу отсека буфера защелкой в левом нижнем углу дверцы.
- Извлеките контейнер с израсходованными реагентами и утилизируйте его содержимое в соответствии с применимыми стандартами.

Рисунок 13. Извлечение контейнера с израсходованными реагентами



ПРИМЕЧАНИЕ

При извлечении контейнера поддерживайте его другой рукой снизу.

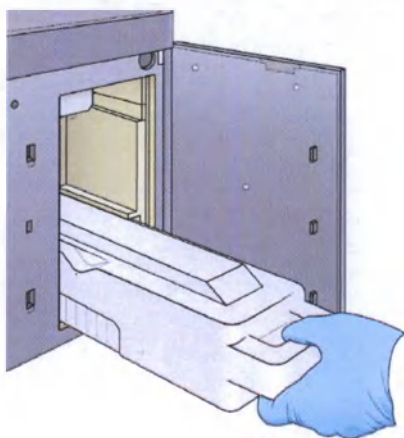


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может возникнуть при вдыхании, употреблении внутрь, контакте с кожей и контакте с глазами. Надевайте средства индивидуальной защиты, включая защиту глаз, перчатки и лабораторный халат, в соответствии с риском контакта. Обращайтесь с использованными реагентами как с химическими отходами и утилизируйте их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и требованиями. Дополнительная информация по окружающей среде, здоровью и безопасности приводится в паспорте безопасности по ссылке support.illumina.com/sds.html.

3. Задвиньте пустой контейнер для израсходованных реагентов в отсек для буфера до упора. При установке контейнера в правильное положение должен прозвучать щелчок.

Рисунок 14. Загрузка пустого контейнера для израсходованных реагентов.



Загрузка картриджа с буфером

1. Извлеките использованный картридж с буфером из верхнего отсека. Для поднятия и вытягивания картриджа с буфером требуется некоторое усилие.
2. Задвиньте новый контейнер с буфером в отсек для буфера до упора. При установке картриджа в правильное положение должен прозвучать щелчок, код картриджа с буфером появляется на экране и выполняется проверка датчика.

Рисунок 15. Загрузка картриджа с буфером



3. Закройте дверцу отсека для буфера и выберите «Next» (далее).

Загрузка картриджа с реагентами

1. Откройте дверцу отсека для реагентов защелкой в правом нижнем углу дверцы.
2. Извлеките использованный картридж с реагентами из отсека для реагентов. Утилизируйте не использованное содержимое в соответствии с применимыми

стандартами.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

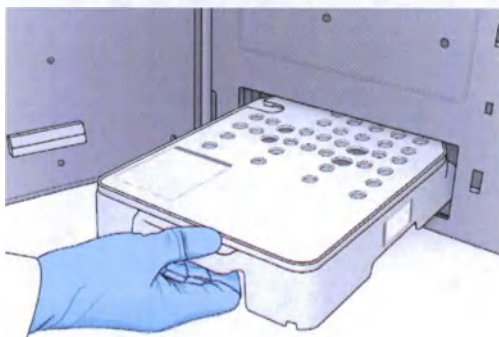
Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может возникнуть при вдыхании, употреблении внутрь, контакте с кожей и контакте с глазами. Надевайте средства индивидуальной защиты, включая защиту глаз, перчатки и лабораторный халат, в соответствии с риском контакта. Обращайтесь с использованными реагентами как с химическими отходами и утилизируйте их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и требованиями. Дополнительная информация по окружающей среде, здоровью и безопасности приводится в паспорте безопасности по ссылке support.illumina.com/sds.html.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для облегчения безопасной утилизации неиспользованных реагентов емкость в положении 6 снимается. Дополнительная информация приводится в разделе *Извлечение использованной емкости в положении №6* на странице 29.

3. Задвиньте картридж с реагентами в отсек для реагента до упора и закройте дверцу отсека для реагентов.

Рисунок 16. Загрузка картриджа с реагентами

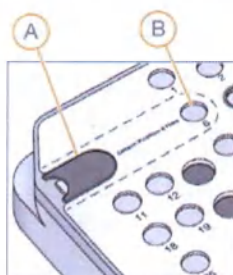


4. Выберите «Load» (загрузка). Программное обеспечение перемещает картридж в нужное положение автоматически (~30 секунд), код картриджа с реагентами появляется на экране и выполняется проверка датчиков.
5. Выберите «Next» (далее).

Извлечение использованной емкости в положении № 6

1. После извлечения *использованного* картриджа с реагентами из прибора, снимите защитную резиновую крышку над отверстием возле положения № 6.

Рисунок 17. Съёмное положение № 6



- A. Защитная резиновая крышка
B. Положение №6

2. Нажмите вниз на прозрачный пластиковый выступ и сдвиньте его влево для

извлечения емкости.

3. Утилизируйте емкость в соответствии с применимыми стандартами.

Просмотрите результаты проверки перед прогоном.

Программное обеспечение выполняет автоматическую проверку системы перед прогоном. Во время проверки на экране появляются следующие индикаторы:

- ▶ **Серая**  **отметка** — проверка пока не выполнялась.
- ▶ **Пиктограмма**  **хода выполнения** — проверка выполняется.
- ▶ **Зеленая**  **отметка** — проверка пройдена.
- ▶ **Красная**  — проверка не пройдена. Для любых пунктов, которые не прошли проверку, требуется действие до продолжения работы. См. *Устранение ошибок автоматической проверки на странице 49*.

Для остановки проверки перед прогоном в ходе ее выполнения нажмите кнопку «**Cancel**» (отмена). Для повторного запуска проверки нажмите кнопку «**Retry**» (повторить). Проверка возобновится с первой незавершенной или непройденной проверки.

Для просмотра результата каждой отдельной проверки в категории, выберите вкладку «**Category**» (категория).

Если прибор не настроен для запуска прогона автоматически, запустите прогон после завершения автоматической проверки перед прогоном.

Запуск прогона

После завершения автоматической проверки перед прогоном выберите «**Start**» (пуск). Начинается прогон секвенирования.

Для настройки системы для автоматического запуска прогона после успешной проверки см. *Установка запуска прогона и данных о работе прибора на странице 19*.



ВНИМАНИЕ

Не выходите из Windows. Если выйти из Windows во время прогона секвенирования, прогон остановится.

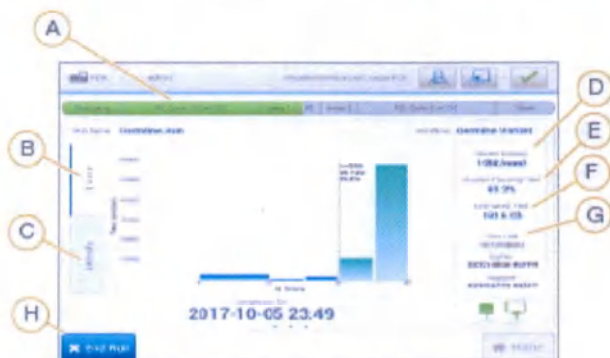
ПРИМЕЧАНИЕ

Реагенты нельзя оставлять в не работающем приборе более чем на 24 часа.

Отслеживание хода прогона

- 1 Отслеживайте ход прогона, интенсивности и оценки качества по мере появления показателей на экране.

Рисунок 18. Ход прогона секвенирования и показатели



- А. Ход прогона** — Показывает текущий этап и количество завершенных циклов для каждого считывания. Линия хода выполнения не пропорциональна скорости прогона на каждом этапе. Расчетные дата и время завершения прогона показаны в

нижней части.

- В. Оценка качества (Q-Score)** — Показывает распределение оценок качества (Q-score). См. *Оценка качества на странице 56*.
- С. Интенсивность** — Показывает значения интенсивности кластеров для 90-го перцентиля для каждой клетки. Цвета на графике указывают каждое основание: красный – аденозин (A), зеленый – цитозин (C), синий – гуанин (G), черный – тимин (T).
- Д. Плотность кластеров (К/мм²)** — Показывает количество кластеров, выявленных в прогоне.
- Е. Кластеры, прошедшие фильтр (%)** — Показывает процент кластеров, прошедших фильтр. См. *Кластеры, прошедшие фильтр на странице 56*.
- Ф. Расчетный выход (Gb)** — Показывает количество оснований, ожидаемое для прогона.
- Г. Информация о партии** — Показывает номера партий наборов реагентов для секвенирования. Для проточной ячейки показан серийный номер.
- Н. Завершить прогон** — Завершает текущий прогон секвенирования.

ПРИМЕЧАНИЕ

После выбора «Home» (главный экран), вернуться к просмотру показателей невозможно. Тем не менее, показатели прогона доступны при использовании Local Run Manager в NOS. Выберите Local Run Manager на главном экране или удаленно с использованием веб-браузера на сетевом компьютере.

ВНИМАНИЕ

Если прогон секвенирования был остановлен пользователем преждевременно, наборы реагентов, использованные для прогона, будут считаться непригодными для использования.

Показатели циклов прогона

Показатели прогона появляются в различных временных точках прогона.

- ▶ На этапах создания кластеров показателей не появляется.
- ▶ Первые 5 циклов отведены для создания шаблона.
- ▶ Показатели прогона появляются после цикла 25, включая плотность кластеров, кластеры, прошедшие фильтр, выход и оценки качества.

Передача данных

Состояние	Local Run Manager	Папка выходных данных
Подключено		
Подключено, идет передача данных		
Не подключено		
Выключено		

Если передача данных прерывается во время прогона, данные временно сохраняются на компьютере прибора. После восстановления подключения передача данных возобновляется автоматически. Если подключение не восстановлено до завершения прогона, перенесите данные с компьютера прибора вручную перед началом последующего прогона.

Просмотр данных прогона и образца

Для просмотра данных прогона и образца выберите название прогона на панели

управления Local Run Manager.

Резюме результатов анализа представлено на следующих 3 вкладках:

- ▶ Обзор прогона
- ▶ Информация о секвенировании
- ▶ Образцы и результаты

Вкладка обзора прогона

На вкладке обзора прогона приводится информация о прогоне, резюме показателей секвенирования и расположение папки прогона.

Заголовок раздела	Описание
Название/код прогона	Название, присвоенное прогону при создании.
Создан:	Имя пользователя, создавшего прогон.
Описание	Описание прогона, если приводится.
Папка выходных данных прогона	Путь к папке выходных данных прогона секвенирования. Выберите пиктограмму копирования в буфер обмена  для быстрого доступа к папке выходных данных.
Всего кластеров	Количество кластеров в прогоне.
% Кластеров ПФ	Процент кластеров, прошедших фильтр.
% ≥ Q30 (Считывание 1)	Процент считываний в Считывании 1 с оценкой качества 30 (Q30) или выше.
% ≥ Q30 (Считывание 2)	Процент считываний в Считывании 2 с оценкой качества 30 (Q30) или выше.
Последний оцененный цикл	Последний цикл в прогоне с оценкой качества. Если прогон не был завершен досрочно, данное значение представляет последний цикл в прогоне.

Вкладка информации о секвенировании

На вкладке информации о секвенировании приводится резюме параметров прогона секвенирования. На вкладке информации о секвенировании приводится следующая информация.

Заголовок раздела	Описание
Название прибора	Название прибора, на котором выполнялся прогон.
Секвенирование выполнил:	Имя пользователя, начавшего прогон.
Начало секвенирования	Дата и время начала прогона секвенирования.
Версия RTA	Версия программного обеспечения RTA, использовавшаяся в прогоне.
Версия модуля	Версия модуля анализа, назначенного для прогона.
Длины считываний	Количество считываний и циклов для каждого считывания, выполненных в течение прогона.
Информация о проточной ячейке	Штрих-код, номер компонента, номер партии и дата окончания срока годности проточной ячейки, использовавшейся для прогона.
Информация о картридже с буфером	Штрих-код, номер компонента, номер партии и дата окончания срока годности картриджа с буфером, использовавшегося для прогона.
Информация о картридже с реагентами	Штрих-код, номер компонента, номер партии и дата окончания срока годности картриджа с реагентами, использовавшегося для прогона.

Вкладка образцов и результатов

Информация, которая приводится на вкладке образцов и результатов, специфична для модуля анализа, использовавшегося для прогона. Вкладка образцов и результатов может содержать поля со следующей информацией.

Заголовок раздела	Описание
Выбор анализа	Выпадающий список всех анализов, выполненных по данным, полученным при прогоне секвенирования. Каждый раз при выполнении данного анализа присваивается последовательный номер. Результаты приводятся отдельно.
Папка анализа	Путь к папке анализа. Выберите пиктограмму копирования в буфер обмена  для быстрого доступа к папке анализа.
Повторный анализ	Команда повторного анализа данных прогона секвенирования. Команда позволяет выбор редактирования параметров анализа или продолжения без

изменений.

Возможные состояния прогона

В колонке «Status» (состояние) на панели управления показано состояние каждого перечисленного прогона. В следующей таблице описаны возможные состояния прогона и цвет строки состояния в колонке «Status» (статус).

Состояние	Цвет строки состояния	Описание состояния
Готово к секвенированию	Нет	Ожидание начала прогона секвенирования.
Секвенирование выполняется	Синий	Секвенирование выполняется
Секвенирование безуспешно	Красный	Проблема секвенирования. Работа не выполняется.
Секвенирование остановлено	Красный	Секвенирование остановлено. Работа не выполняется.
Секвенирование завершено	Синий	Секвенирование завершено. Строка состояния на 50%.
Первичный анализ Завершено	Синий	Расчет показателей секвенирования завершен. Строка состояния на 50%.
Первичный анализ Безуспешно	Красный	Ошибка анализа RTA. Строка состояния на 25%.
Анализ помещен в очередь	Синий	Ожидание начала анализа.
Анализ выполняется	Синий	Анализ выполняется
Анализ безуспешен	Красный	Проблема при анализе. Работа не выполняется.
Остановка анализа	Красный	Получен запрос на остановку анализа.
Анализ остановлен	Красный	Анализ остановлен. Работа не выполняется.
Анализ завершен	Зеленый	Работа завершена. Строка состояния на 100%.

Повторное выполнение или остановка анализа

Если вы хотите повторно выполнить анализ после остановки анализа, если анализ был выполнен с ошибками, или если вы хотите повторно анализировать прогон с другими настройками. Можно запросить повторное выполнение анализа на панели управления Local Run Manager или на вкладке образцов и результатов.

Вы можете отменить анализ в Local Run Manager, начать другой прогон секвенирования, и затем вернуться для повторного выполнения анализа исходного прогона позже.

Остановка анализа в Local Run Manager

1. На странице активных прогонов, нажмите **«More Options»** (дополнительные варианты) возле названия прогона, который нужно остановить.
2. Выберите  **«Stop Analysis»** (остановить анализ).

Повторный анализ из активных прогонов

1. На странице активных прогонов, выберите пиктограмму **«More Options»** (дополнительные варианты) возле названия прогона, который нужно анализировать повторно.
2. Выберите  **«Requeue»** (выполнить повторно).
3. При появлении подсказки, выберите один из следующих вариантов:
 - Выберите **«Edit Setup»** (редактировать настройки) для изменения параметров анализа. На странице повторного выполнения анализа измените требуемые настройки и затем выберите **«Requeue Analysis»** (Повторное выполнение анализа).
 - Выберите **«Requeue»** (выполнить повторно). Анализ начнется с текущими параметрами анализа.

Повторный анализ со страницы результатов

1. Выберите название прогона на странице активных прогонов.
2. **[Не обязательно]** Измените папку выходных данных. См. *Изменение расположения папки выходных данных прогона на странице 34*.
3. Выберите на вкладку «Образцы и результаты».
4. Выберите  «**Requeue Analysis**» (повторный анализ).
5. При появлении подсказки, выберите один из следующих вариантов:
 - ▶ Выберите «**Edit Setup**» (редактировать настройки) для изменения параметров анализа. На странице повторного выполнения анализа измените требуемые настройки и затем выберите «**Requeue Analysis**» (Повторное выполнение анализа).
 - ▶ Выберите «**Requeue**» (выполнить повторно). Анализ начнется с текущими параметрами анализа.

Изменение расположения папки выходных данных прогона

Расположение папки выходных данных прогона можно изменить перед повторным выполнением анализа прогона. Изменение папки выходных данных прогона не требуется, так как при повторном выполнении анализа результаты прежних анализов не удаляются.

1. Выберите прогон из списка на панели управления активными прогонами.
2. Выберите «**Run Overview**» (обзор прогона).
3. Выберите пиктограмму «Edit»  (редактировать) и введите новый путь к папке. Хотя расположение файла может изменяться, название папки с выходными данными прогона изменить нельзя.
4. Обязательно следуйте указаниям по пути к файлам UNC, как описано в разделе *Установка папки выходных данных по умолчанию на странице 19*. Выберите пиктограмму «Save»  (сохранить).

Автоматическое промывание после прогона

После завершения прогона секвенирования программное обеспечение запускает автоматическое промывание после секвенирования с использованием промывочного раствора, который имеется в картридже с буфером, и NaOCl, который имеется в картридже с реагентами.

Автоматическое промывание после прогона занимает примерно 90 минут. После завершения промывания становится активной кнопка «Home» (главная). Результаты секвенирования остаются видимыми на экране в течение промывания.

После промывания

После промывания системы подачи (трубки) остаются в нижнем положении, чтобы не допустить попадания воздуха в систему. Оставьте картриджи на месте до следующего прогона.

Извлечение набора реагентов

В редких случаях может потребоваться извлечь все компоненты набора реагентов из прибора. Для этого используйте экран «Quick Wash» (быстрое промывание) для извлечения расходных материалов.

1. Выберите «Perform Wash» (выполнить промывание) и затем выберите «Quick Wash» (быстрое промывание).
2. Дверца проточной ячейки откроется, и картридж с реагентами переместится в положение извлечения.
3. Извлеките проточную ячейку, картридж с буфером и картридж с реагентами.
4. Извлеките контейнер с израсходованными реагентами и утилизируйте его содержимое в соответствии с применимыми стандартами.
5. Задвиньте пустой контейнер для израсходованных реагентов в отсек для буфера до упора. При установке контейнера в правильное положение должен прозвучать

щелчок

6. Выберите «Exit» (выход), чтобы вернуться на главный экран NOS

Глава 5 Техническое обслуживание

Введение	34
Выполнение промывания вручную	34
Замена воздушного фильтра	37

Введение

Процедуры технического обслуживания включают промывание прибора вручную и замену воздушного фильтра. Также описаны выключение прибора и варианты перезагрузки.

- ▶ **Промывания прибора** — Автоматическое промывание после прогона после каждого прогона секвенирования поддерживает функциональные характеристики прибора. Тем не менее, в определенных условиях периодически требуется промывание, выполняемое вручную. См. *Выполнение промывания вручную на странице 36*.
- ▶ **Замена воздушного фильтра** — Регулярная замена воздушного фильтра обеспечивает надлежащий поток воздуха через прибор.

Профилактическое обслуживание

Компания «Иллюмина» (Illumina) рекомендует планировать профилактическое техническое обслуживание ежегодно. Если у вас не заключен договор на техническое обслуживание, свяжитесь с вашим территориальным менеджером или обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina) для проведения платного профилактического технического обслуживания.

Выполнение промывания вручную

Промывание вручную запускается на главном экране. Варианты промывания включают быстрое промывание и промывание вручную после прогона.

Типы промывания	Описание
Длительность быстрого промывания: 20 минут	Промывание системы подаваемым пользователем промывочным раствором лабораторной воды и Tween 20 (Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)). • Требуется каждые 14 суток простоя прибора с установленными картриджем с реагентами и картриджем с буфером. • Требуется каждые 7 суток, если прибор находится в сухом состоянии (Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)).
Длительность промывания вручную после прогона: 90 минут	Промывание системы подаваемым пользователем промывным раствором лабораторной воды и Tween 20 (Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)) и 0,12% раствором гипохлорита натрия (Лоток для промывки (Reagent Wash Tray)). Требуется, если автоматическое промывание после прогона не выполнялось.

Для промывания вручную требуется Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray), поставляемые с прибором, и использованная проточная ячейка. И использованная проточная ячейка может применяться для промывания прибора до 20 раз.

Рисунок 19. Оригинальный лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray).

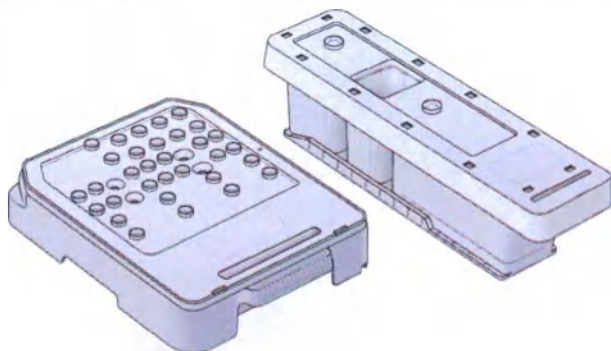
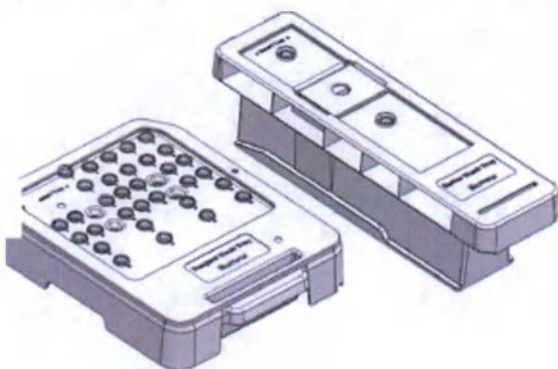


Рисунок 20. Новый лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray).



Подготовка к промыванию вручную после прогона

Выберите подготовку к промыванию вручную после прогона, как описано ниже, или приготовьтесь к быстрому промыванию (следующий раздел). Если вы собираетесь выполнить промывание вручную после прогона, пропустите раздел быстрого промывания и начните с *Загрузки использованной проточной ячейки и лотков для промывания на странице 38.*

Поставляемые пользователем расходные материалы	Объем и описание
NaOCl	1 мл, разведенный до 0,12% Заливается в Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) (положение №28)
100% Tween 20 Вода чистоты для лаборатории	Используется для приготовления 125 мл промывочного раствора Tween 20 0,05% Заливается в Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) (центральная емкость)

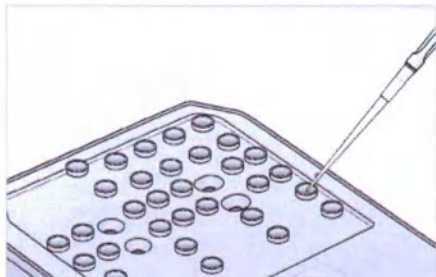
ПРИМЕЧАНИЕ

Всегда используйте свежее разведение NaOCl, приготовленное в последние 24 часа. Если вы приготовили объем более 1 мл, храните оставшееся разведение при 2°C – 8°C для использования в течение следующих 24 часов. Иначе утилизируйте оставшееся разведение NaOCl.

1. Залейте следующие объемы в микроцентрифужную пробирку для приготовления 1 мл 0,12% NaOCl:
 - ▶ 5% NaOCl (24 мкл)

- ▶ Вода лабораторного класса чистоты (976 мкл)
- 2. Переверните пробирку для перемешивания.
- 3. Добавьте 1 мл 0,12% NaOCl в лоток для промывки реагента. Нужная емкость соответствует положению №28 заполненного лотка.

Рисунок 20. Заполнение NaOCl



- 4. Смешайте следующие объемы для приготовления 0,05% промывочного раствора Tween 20:
Оригинальный лоток для промывочного реагента (Reagent Wash Tray)
 - ▶ 100% Tween 20 (62 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (125 мл)
 - ▶ Добавьте 125 мл промывочного раствора в центральную емкость лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)
 Новый лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)
 - ▶ 100% Tween 20 (75 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (150 мл)
 - ▶ Добавьте 150 мл промывочного раствора в центральную емкость лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)
- 5. Выберите «Perform Wash» (выполнить промывание) и затем выберите «Manual Post-Run Wash» (промывание вручную после прогона).

Подготовка к быстрому промыванию

Можно подготовиться к быстрому промыванию, как описано ниже, в качестве альтернативы *Подготовки к промыванию вручную после прогона на странице 37.*

Поставляемые пользователем расходные материалы			Объем и описание
100% Tween лабораторного класса чистоты	20	Вода	Используется для приготовления 40 мл промывочного раствора Tween 20 класса 0,05% Заливается в Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) (центральная емкость)

- 1. Смешайте следующие объемы для приготовления 0,05% промывочного раствора Tween 20:
 - ▶ 100% Tween 20 (20 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (40 мл)
- 2. Добавьте 40 мл промывочного раствора в центральную емкость Лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray).
- 3. Выберите «**Perform Wash**» (выполнить промывание) и затем выберите «**Quick Wash**» (быстрое промывание)

Загрузка использованной проточной ячейки и лотков для промывания

- 1. Если использованная проточная ячейка не установлена, загрузите использованную проточную ячейку. Выберите «**Load**» (загрузка), и затем «**Next**» (далее).
- 2. Извлеките контейнер с израсходованными реагентами и утилизируйте его

содержимое в соответствии с применимыми стандартами.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может возникнуть при вдыхании, употреблении внутрь, контакте с кожей и контакте с глазами. Надевайте средства индивидуальной защиты, включая защиту глаз, перчатки и лабораторный халат, в соответствии с риском контакта. Обращайтесь с использованными реагентами как с химическими отходами и утилизируйте их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и требованиями. Дополнительная информация по окружающей среде, здоровью и безопасности приводится в паспорте безопасности по ссылке support.illumina.com/sds.html.

3. Задвиньте пустой контейнер для израсходованных реагентов в отсек для буфера до упора.
4. Извлеките использованный буферный картридж предыдущего прогона, если он установлен.
5. Загрузите Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) с раствором для промывания.
6. Извлеките использованный картридж с реагентами предыдущего прогона, если он установлен.
7. Загрузите Лоток для промывки (Reagent Wash Tray).
8. Выберите «**Next**» (далее). Проверка перед промыванием начинается автоматически.

Запустите промывание

1. Выберите «**Start**» (запуск).
2. После завершения промывания выберите «**Home**» (главная).

После промывания

После промывания системы подачи остаются в нижнем положении, чтобы не допустить попадания воздуха в систему. Оставьте картриджи на месте до следующего прогона.

Замена фильтра воздушного

Новые системы поставляются с тремя запасными воздушными фильтрами. Их следует сохранить и использовать при получении от прибора запроса на замену фильтра.

ПРИМЕЧАНИЕ

При необходимости пользователи могут заказать более трех фильтров воздушных.

Воздушный фильтр обеспечивает поток воздуха через прибор. Программное обеспечение отображает уведомление о замене воздушного фильтра каждые 90 суток. При появлении подсказки выберите «**Remind in 1 day**» (напомнить через 1 день), или выполните следующую процедуру и выберите «**Filter Changed**» (фильтр заменен). После выбора «**Filter Changed**» (фильтр заменен), отсчет 90 суток сбрасывается.

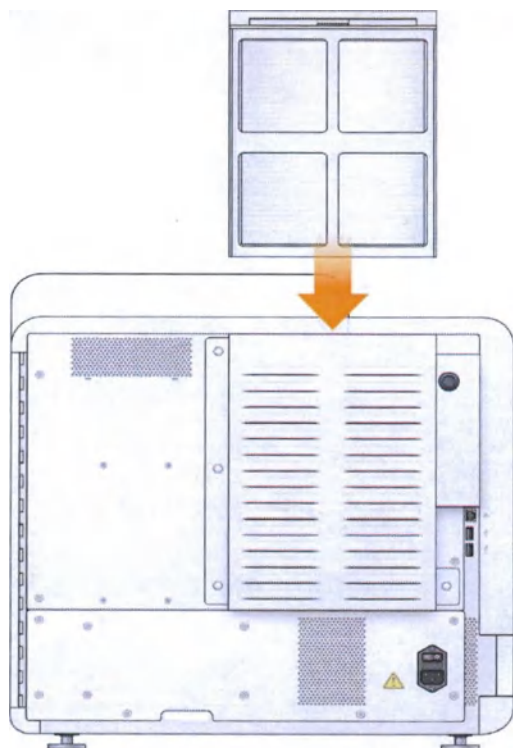
1. Извлеките новый воздушный фильтр из упаковки и запишите дату установки на корпусе фильтра.
2. На задней панели прибора нажмите вниз на верхнюю часть отсека фильтра для извлечения отсека.
3. Удерживайте верхнюю часть отсека фильтра и полностью вытяните отсек из прибора.
4. Извлеките и утилизируйте прежний воздушный фильтр.
5. Вставьте новый воздушный фильтр в отсек.

ПРИМЕЧАНИЕ

Воздушный фильтр будет работать неправильно, если установить его наоборот. Убедитесь, что воздушный фильтр вставлен в отсек таким образом, что видна зеленая стрелка вверх и не видна табличка с предупреждением. Стрелка должна указывать на рукоятку отсека фильтра.

6. Задвиньте отсек фильтра в прибор. Нажмите на верхнюю часть отсека фильтра и установите его до щелчка.

Рисунок 22. Установка воздушного фильтра



Приложение A Local Run Manager Административные установки и задачи

Введение.....	A
Управление пользователями.....	A
Системные настройки.....	C
Настройки модуля.....	D
Журналы регистрации событий.....	E

Введение

Следующие установки и задачи требуют администраторских полномочий пользователя:

- ▶ **Управление учетными записями пользователя** — добавление пользователей, присвоение полномочий и установка паролей.
- ▶ **Редактирование системных настроек NOS** — позволяет редактировать NOS с использованием пиктограммы управления прибором на главном экране секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx.
- ▶ **Управление системными настройками Local Run Manager** — установка параметров безопасности системы, интервалов технического обслуживания и служебных учетных записей.
- ▶ **Повторное подключение к папке прогона** — если папка прогона была удалена и затем восстановлена, позволяет связать прогон в восстановленной папке для помещения в задачи анализа.
- ▶ **Просмотр журнала регистрации событий** — отслеживает частоту доступа и активность пользователей.

Разрешение на выполнение следующей задачи настраивается в управлении пользователем:

- ▶ **Перезагрузка в исследовательский режим** — позволяет выполнять команду перезагрузки в исследовательский режим с изменением программного обеспечения на исследовательский режим (RUO).
- ▶ **Редактирование настроек пользователя** — позволяет настраивать установки модуля, такие как загрузка файлов списка для использования во всех прогонах в конкретном модуле анализе.
- ▶ **Повторное выполнение анализа** — позволяет редактировать параметры и затем выполнять анализ повторно. См. *Повторное выполнение или остановка анализа на странице 33*.

Управление пользователями

Все учетные записи пользователя перечислены на странице управления пользователями, включая имя, фамилию и имя пользователя для каждой учетной записи. В подробных данных каждой учетной записи осуществляется управление ролями и связанными с ними правами доступа. Можно присвоить две роли, администратора или пользователя.

- ▶ **Роль администратора** — роли администратора по умолчанию присвоены все права доступа.
- ▶ **Роль пользователя** — роли пользователя настраиваются с использованием подгрупп доступных прав доступа. Все пользователи могут создавать прогоны вне зависимости от настроек прав доступа.

Просматривать страницу управления пользователем может только пользователь-администратор.

ПРИМЕЧАНИЕ

Создайте несколько учетных записей пользователей-администраторов. Если единственный пользователь-администратор будет заблокирован, разблокировать прибор сможет только служба технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).

ПРИМЕЧАНИЕ

В зависимости от размера экрана, на котором просматривается программное обеспечение, меню «Tools» (инструменты) может быть сжатым под меню  в левом верхнем углу.

Права доступа пользователей

Право доступа	Описание	Роль администратора	Роль пользователя
Редактирование системных настроек Local Run Manager	Установка настроек безопасности, технического обслуживания и служебных учетных записей	Допускается	Не допускается
Выход в Windows	Выход из NOS и доступ к компьютеру прибора.	Допускается	Не допускается
Редактирование настроек модуля	Загрузка файл списков для модулей анализа	Допускается	Допускается, если выбрано
Управление учетными записями пользователей	Создание и редактирование учетных записей пользователей	Допускается	Не допускается
Свертывание NOS и доступ к компьютеру	Свертывание NOS и доступ к компьютеру прибора.	Допускается	Не допускается
Повторный анализ	Повторный анализ прогонов, редактирование параметров анализа	Допускается	Допускается, если выбрано
Перезагрузка в исследовательский режим	Изменение программного обеспечения прибора на режим RUO	Допускается	Допускается, если выбрано
Просмотр журналов регистрации событий	Просмотр, фильтрация и экспорт журналов регистрации событий	Допускается	Не допускается

Создание нового пользователя

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «Tools» (инструменты), и затем выберите «**User Management**» (управление пользователями).
2. На странице управления пользователями выберите «**Create User**» (создать пользователя).
3. В диалоговом окне создания нового пользователя введите имя и фамилию нового пользователя.
4. В поле имени пользователя введите имя пользователя.
Имена пользователей должны быть уникальными и не могут использоваться повторно или редактироваться.
5. В поле «**New Password**» (новый пароль) введите временный пароль.
Временные пароли не сохраняются в истории паролей и могут использоваться повторно.
6. В поле «**Confirm Password**» (подтвердите пароль) повторно введите временный пароль.
7. Для выбора роли выберите «**Admin**» (администратор) или «**User**» (пользователь) для переключения между вариантами.
8. Выберите права допуска пользователя в зависимости от указанной роли пользователя.
9. Выберите «**Create User**» (создать пользователя).

Сброс пароля пользователя

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «Tools» (инструменты), и затем выберите **User Management** (управление пользователями).
2. Найдите имя пользователя, которого вы хотите отредактировать, и выберите пиктограмму «**Edit**»  (редактировать).
3. В поле «**New Password**» (новый пароль) введите временный пароль.
Временные пароли не сохраняются в истории паролей и могут использоваться повторно.
4. В поле «**Confirm Password**» (подтвердите пароль) повторно введите временный пароль.
5. Выберите «**Update User**» (обновить пользователя).

Разблокирование пароля пользователя

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «Tools» (инструменты), и затем выберите **User Management** (управление пользователями).
2. Найдите имя пользователя, которого вы хотите отредактировать, и выберите пиктограмму «Edit»  (редактировать).
3. В диалоговом окне редактирования пользователя выберите  «Unlock User» (разблокировать пользователя).
4. В поле «New Password» (новый пароль) введите временный пароль.
5. В поле «Confirm Password» (подтвердите пароль) повторно введите временный пароль.
6. Выберите «Update User» (обновить пользователя).

Изменение прав доступа пользователя

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «Tools» (инструменты), и затем выберите «User Management» (управление пользователями).
2. Найдите имя пользователя, которого вы хотите отредактировать, и выберите пиктограмму «Edit»  (редактировать).
3. Для изменения роли выберите «Admin» (администратор) или «User» (пользователь) для переключения между вариантами.
4. Выберите права допуска пользователя в зависимости от указанной роли пользователя.
5. Выберите «Update User» (обновить пользователя).

Удаление пользователя

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «Tools» (инструменты), и затем выберите «User Management» (управление пользователями).
2. Найдите имя пользователя, которого вы хотите отредактировать, и выберите пиктограмму «Edit»  (редактировать).
3. В диалоговом окне создания нового пользователя выберите «Delete User» (удалить пользователя).
После удаления пользователя вы не сможете повторно создать учетную запись с тем же именем.
4. При появлении подсказки удаления пользователя, выберите «Delete» (удалить).

Системные настройки

Системные настройки – общие параметры безопасности пользователя и автоматизированного управления данными.

- ▶ Настройки безопасности пользователей включают длительность срока действия пароля, максимальное количество попыток ввода и длительность времени ожидания при бездействии.
- ▶ Настройки управления данными включают автоматическую очистку неактивных папок прогона и частоту резервного копирования базы данных, и включает команду немедленного резервного копирования базы данных.
- ▶ Настройте учетные записи режима анализа и режима задач для Windows, если ваша папка выходных данных прогона находится в сетевом пути. По умолчанию это местная системная учетная запись.

Просматривать страницу системных настроек может только пользователь-администратор.

ПРИМЕЧАНИЕ

В зависимости от размера экрана, на котором просматривается программное обеспечение, меню «Tools» (инструменты) может быть сжатым под меню  в левом верхнем углу.

Определение системных настроек безопасности

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «**Tools**» (инструменты), и затем выберите «**System Settings**» (системные настройки).
2. Выберите вкладку «**Security**» (безопасность).
3. Укажите количество дней, после которого срок годности пароля истекает и пароль должен быть сброшен.
4. Укажите количество дней, после которых пользователь получит напоминание о сбросе пароля до его истечения.
5. Укажите максимальное количество попыток ввода пользователем неправильных данных для входа до блокировки системы.
6. Укажите количество минут, в течение которых система может оставаться не активной до автоматического выхода пользователя из системы.
7. Выберите «**Save**» (сохранить).

Определение настроек обслуживания системы

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «**Tools**» (инструменты), и затем выберите **System Settings** (системные настройки).
2. Выберите вкладку «**Maintenance**» (обслуживание).
3. Для включения автоматического удаления неактивных папок, отметьте кнопку-флажок «**Enable Automatic Deletion**» (включение автоматического удаления).
При включении система удаляет неактивные папки из папки анализа по умолчанию после указанного времени.
4. Если отмечена кнопка-флажок «**Enable Automatic Deletion**» (включение автоматического удаления), укажите количество дней до активации команды автоматического удаления.
5. Для указания расположения резервного копирования базы данных, укажите требуемый путь к расположению резервного копирования базы данных. Для восстановления базы данных из резервного копирования, обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
6. В поле «**Backup Period**» введите длительность в сутках между каждым резервным копированием.
7. Для того, чтобы выполнить немедленное резервное копирование, выберите «**Backup Now**» (выполнить резервное копирование сейчас).
8. Выберите «**Save**» (сохранить).

Определение настроек учетной записи обслуживания системы

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «**Tools**» (инструменты), и затем выберите «**System Settings**» (системные настройки).
2. Выберите на вкладку «**Service Accounts**» (служебные учетные записи).
3. Для включения учетных записей службы анализа Windows и службы задач, выберите «**Windows Account**» (учетная запись Windows).
Убедитесь, что учетная запись службы, которую вы вводите, имеет разрешение на чтение и запись в папку выходных данных прогона.
4. В поле имени пользователя введите имя пользователя.
Для приборов, работающих в Windows 10 с локальной учетной записью, включите \ в имя пользователя (например, `.\username`). Для пользователей домена включите имя домена, затем обратный слеш в имени пользователя (например, `domain\username`).
5. В поле пароля введите пароль. Операционная система Windows 10 требует смены пароля Windows каждые 180 дней. Обязательно обновите учетную запись Windows в диспетчере локальных запусков (**Local Run Manager**) с тем же паролем, что и в операционной системе Windows.
6. Выберите «**Save**» (сохранить).

Настройки модуля

На странице настроек модуля приводится список установленных модулей анализа в левой навигационной панели. Каждое название модуля анализа открывает страницу, на

которой указаны версия модуля и дата последнего изменения.

Для модулей, для которых требуются списки, добавьте к модулю файлы списков, чтобы они были доступны для всех прогонов. Для этого требуются права доступа администратора.

1. В навигационной строке панели управления нажмите меню «**Tools**» (инструменты), и затем нажмите «**Module Settings**» (настройки модуля).

ПРИМЕЧАНИЕ

В зависимости от размера экрана, на котором просматривается программное обеспечение, меню

«**Tools**» (инструменты) может быть сжатым под верхним левым меню .

2. Нажмите на название модуля в левой навигационной панели.
3. Нажмите «**Add Manifest(s)**» (добавить списки).
4. Перейдите к файлу списка, выберите список, который нужно добавить, и нажмите «**Open**» (открыть).

Журналы регистрации событий

В журналах регистрации событий записывается информация о конкретных действиях, таких как доступ пользователей, изменения профилей пользователей и изменения в системе, прогоне или параметрах анализа. Каждая запись журнала регистрации событий включает следующую информацию:

- ▶ Когда, в форме даты в формате ГГГГ-ММ-ДД и времени в 24-часовом формате.
- ▶ Кто, в форме имени пользователя, начавшего действие.
- ▶ Что, в форме короткого заданного описания принятых мер.
- ▶ Пункт, для которого выполнялось действие, в форме одной из 4 категорий: пользователь, прогон, анализ или система.
- ▶ Для сортировки списка журналов регистрации событий, выберите заголовок любой колонки для сортировки в порядке убывания или возрастания.

Просматривать страницу журналов регистрации событий может только пользователь-администратор.

ПРИМЕЧАНИЕ

В зависимости от размера экрана, на котором просматривается программное обеспечение, меню

«**Tools**» (инструменты) может быть сжатым под верхним левым меню .

Фильтрация журналов регистрации событий

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «**Tools**» (инструменты), и затем выберите «**Audit Trails**» (журнал регистрации событий).
2. На странице журналов регистрации событий выберите пиктограмму фильтра .

Примечание

Можно применять фильтры для ранее отфильтрованных результатов для дальнейшего уточнения списка. Для применения фильтра ко всей базе данных журналов регистрации событий, отмените предыдущие фильтры, прежде чем продолжить.

Фильтрация по дате

1. Выберите на пиктограмму календаря  и выберите дату начала.
2. Выберите на пиктограмму календаря  и выберите дату окончания.
3. Выберите «**Filter**» (фильтр).

Фильтрация по имени пользователя

1. В поле «**Who**» (кто) введите имя пользователя.
Можно ввести любую часть имени пользователя. Звездочки (*) не требуются.
2. Выберите «**Filter**» (фильтр).

Фильтрация по действию

1. В поле «**What**» (что) введите описание действия.
Можно ввести любую часть описания действия. Звездочки (*) не требуются.

2. Выберите «**Filter**» (фильтр).

Фильтрация по описанию пункта действия

1. В текстовом поле «**Affected Item**» (пункт, для которого выполнялось действие) введите любую часть описания пункта, для которого выполнялось действие. Описание, например, может быть названием прогона, именем пользователя, названием модуля анализа или названием отчета. Можно ввести любую часть описания. Звездочки (*) не требуются.
2. Выберите «**Filter**» (фильтр).

Фильтрация по категории пункта действия

1. Для фильтрации по категории пункта, для которого выполнялось действие, выберите пиктограмму  в поле «**Affected Item**» (пункт, для которого выполнялось действие) и выберите один из следующих вариантов:
 - ▶  **User** (пользователь) — фильтрация списка, показывающая действия пользователя и действия входа пользователя.
 - ▶  **Run** (прогон) — фильтрация списка, показывающая изменения параметров прогона или статуса прогона
 - ▶  **Analysis** (анализ) — фильтрация списка, показывающая изменения параметров анализа или статуса анализа.
 - ▶  **System** (система) — фильтрация списка, показывающая действия на уровне системы, такие как загрузка файлов, обслуживание системы или настройки безопасности.
2. Выберите «**Filter**» (фильтр).

Экспорт журналов регистрации событий

1. В навигационной строке панели управления выберите меню «**Tools**» (инструменты), и затем выберите «**Audit Trails**» (журнал регистрации событий).
2. На странице журналов регистрации событий выберите пиктограмму фильтра .
3. Примените требуемые фильтры.
4. Выберите пиктограмму экспорта . Программное обеспечение создает отчет в формате PDF, включающий имя пользователя, дату экспорта и параметры фильтра.

Пиктограммы журналов регистрации событий

На экране журналов регистрации событий используются следующие пиктограммы.

Пиктограмма	Название	Описание
	Анализ	Обозначает изменение параметров анализа или статуса анализа.
	Прогон	Показывает изменения параметров прогона или статуса прогона.
	Система	Показывает изменения настроек модуля или системных настроек.
	Пользователь	Показывает действие пользователя или действие по входу пользователя в систему.

Приложение В Устранение неисправностей

Введение	G
Выполнение проверки системы	G
Файлы устранения неисправностей	I
Устранение ошибок автоматической проверки	I
Резервуар для отходов заполнен	J
Сообщение об ошибке RAID	J
Ошибка сетевого хранилища	J
Установка настроек системы	K

Введение

При проблемах качества или характеристик прогона, обратитесь в службу технической поддержки Illumina. См. *Техническая помощь на странице 65*.

Проверка системы

Проверка системы не требуется для нормальной работы или обслуживания прибора. Тем не менее, представитель службы технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina) может попросить вас выполнить проверку системы в целях устранения неисправностей.

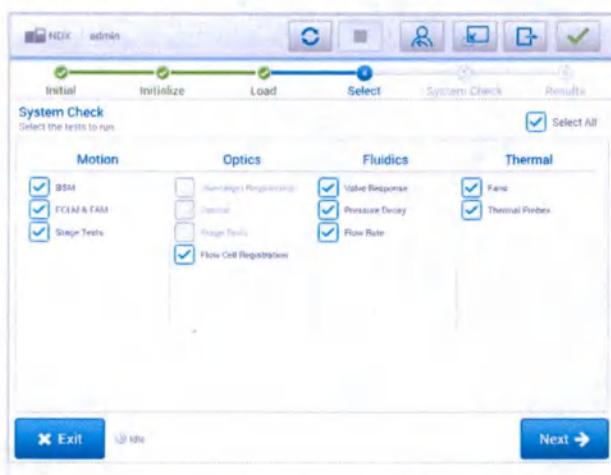
ПРИМЕЧАНИЕ

Если требовалось промывание прибора, выполните промывание перед началом проверки системы.

Начало проверки системы автоматически закрывает операционное программное обеспечение и запускает сервисное программное обеспечение NextSeq 550Dx (NSS). Сервисное программное обеспечение запускается и открывается на экране загрузки, который настроен для использования дополнительного варианта загрузки.

Учетные данные администратора Local Run Manager необходимо использовать для входа в сервисное программное обеспечение до появления экрана загрузки.

Рисунок 23. Доступные системные проверки



Не активные кнопки-флажки на экране выбора показывают проверки, для которых требуется помощь местного представителя компании «Иллюмина» (Illumina).

Выполнение проверки системы

1. На экране «Manage Instrument» управление прибором, выберите «System Check» (проверка системы). При подсказке о закрытии программного обеспечения NOS выберите «Yes» (да).
2. Загрузите набор реагентов следующим образом:

- a. Если использованная проточная ячейка еще не установлена в прибор, загрузите использованную проточную ячейку.
- b. Извлеките контейнер с израсходованными реагентами и снова установите его в прибор.
- c. Добавьте 120 мл воды лабораторного класса чистоты в центральную емкость Лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) и установите его.
- d. Загрузите Лоток для промывки (Reagent Wash Tray). Убедитесь, что Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) пустой и чистый.
3. Выберите «**Load**» (загрузка). Программное обеспечение перемещает проточную ячейку и Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) в нужное положение. Выберите «**Next**» (далее).
4. Выберите «**Next**» (далее). Начинается проверка системы.
5. **[Не обязательно]** После завершения проверки системы выберите «**View**» (просмотр) возле названия проверки для просмотра значений для каждой проверки.
6. Выберите «**Next**» (далее). Откроется отчет проверки системы.
7. Выберите «**Save**» (сохранить) для сохранения отчета в архивный файл. Перейдите к сетевому расположению для сохранения файла.
8. После завершения выберите «**Exit**» (выход).
9. При подсказке о закрытии сервисного программного обеспечения и запуске программного обеспечения NOS выберите «**Yes**» (да). Работа программного обеспечения управления возобновится автоматически.

Проверка движений

Проверка системы	Описание
BSM	Проверка хода и расстояния механизма буферных пипеток (BSM) для подтверждения правильной работы модуля.
FCLM и FAM	Проверка хода и расстояния механизма загрузки проточной ячейки (FCLM) и автоматического модуля жидкостей (FAM) для подтверждения правильной работы модулей.
Проверка подставки	Проверка пределов хода и функций подставки XY и 6 подставок Z, по одной для каждой камеры.

Проверка оптики

Проверка системы	Описание
Регистрация проточной ячейки	Измерение наклона проточной ячейки на оптической плоскости, проверка функции камеры, проверка модуля визуализации и подтверждение регистрации проточной ячейки в нужном положении для визуализации.

Проверка жидкостных систем

Проверка системы	Описание
Реакция клапанов	Проверка точности движений клапанов и насосов и проверка диапазона хода шприцевого насоса.
Снижение давления	Проверка скорости утечки в герметичной жидкостной системе с подтверждением того, что проточная ячейка правильно установлена в положение для секвенирования.
Скорость потока	Проверка функциональности датчиков пузырьков, которые используются для выявления воздуха в трубках для реагентов. Измерение значений скорости потока для проверки на наличие окклюзий или утечек.

Проверка температуры

Проверка системы	Описание
Вентиляторы	Проверка скоростей вентиляторов системы в импульсах в минуту (PPM) для подтверждения работы вентиляторов. Не работающие вентиляторы выдают отрицательное значение.
Температурные датчики	Проверка средней температуры каждого датчика температуры. Не работающие температурные датчики выдают отрицательное значение.

Файлы устранения неисправностей

Представитель службы технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina) может запросить копии файлов для конкретного прогона или сканирования для устранения неисправностей. Обычно для устранения неисправностей используются следующие файлы.

Файлы устранения неисправностей для прогонов секвенирования

Ключевой файл	Папка	Описание
Файл информации о прогоне (RunInfo.xml)	Корневая папка	Содержит следующую информацию: • Название прогона • Количество циклов в прогоне • Количество циклов в каждом считывании • Является ли считывание индексным считыванием • Количество полос и клеток на проточной ячейке
Файл параметров прогона (RunParameters.xml)	Корневая папка	Содержит информацию о параметрах прогона и компонентах прогона. Информация включает RFID, серийный номер, номер компонента и дату окончания срока годности.
Файл настройки RTA (RTAConfiguration.xml)	Корневая папка	Содержит настройки конфигурации RTA для прогона. Файл RTAConfiguration.xml создается в начале прогона.
Файлы InterOp (*.bin)	InterOp	Бинарные файлы отчета. Файлы InterOp обновляются в течение прогона.
Регистрационные файлы	Logs	Регистрационные файлы описывают каждый этап, выполненный прибором в каждом цикле, и последние версии программного обеспечения и прошивки, использовавшиеся для прогона. В файле с названием [InstrumentName]_CurrentHardware.csv перечислены серийные номера компонентов прибора.
Регистрационные файлы ошибок (*ErrorLog*.txt)	RTA logs	Журнал ошибок RTA. Файлы журнала ошибок обновляются при возникновении ошибки.
Общие регистрационные файлы (*GlobalLog*.tsv)	RTA logs	Регистрация всех событий RTA. Общие регистрационные файлы обновляются в течение прогона.
Регистрационные файлы дорожек (*LaneLog*.txt)	RTA logs	Регистрация событий обработки RTA. Регистрационные файлы дорожек обновляются в течение прогона.

Ошибки RTA

Для устранения ошибок RTA сначала проверьте журнал ошибок RTA, который хранится в папке RTALogs. Данный файл отсутствует при успешных прогонах. Приложите журнал ошибок при сообщении о проблемах в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).

Устранение ошибок автоматической проверки

При возникновении ошибок при автоматической проверке выполните следующие рекомендуемые действия для устранения ошибки.

Проверки прогонов секвенирования

Если проверка перед прогоном не пройдена, RFID картриджа с реагентами не блокируется и может быть использована для последующего прогона. Тем не менее, RFID проточной ячейки, картриджа с реагентом и картриджа с буфером будут заблокированы во время инициализации управляющего программного обеспечения, что может потребоваться для устранения ошибки. Перед перезапуском системы пользователь должен извлечь из прибора проточную ячейку, картридж с реагентом и картридж с буфером. Кроме того, расходимые RFID блокируются после прокалывания прокладок из фольги. После считывания RFID проточной ячейки программным обеспечением запускается 7-часовой таймер, после чего проточная ячейка считается заблокированной и непригодной для использования.

Проверки системы	Рекомендуемое действие
Дверцы закрыты	Убедитесь, что дверцы отсеков закрыты.
Расходные материалы загружены	Датчики расходных материалов не регистрируют. Убедитесь, что все расходные материалы загружены правильно. На экранах настройки прогона выберите «Back» (назад) для возврата к этапу загрузки и повторите настройку прогона.
Требуемое программное обеспечение	Отсутствуют необходимые компоненты программного обеспечения. Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Место на диске в приборе	На жестких дисках прибора отсутствует достаточно места для выполнения прогона. Возможно, что не осуществлялась передача данных предыдущего прогона. Очистите данные прогона с жесткого диска прибора.
Сетевое подключение	Сетевое подключение было прервано. Проверьте состояние сети и физическое подключение к сети.
Место на сетевом диске	Сетевой сервер заполнен.

Температура	Рекомендуемое действие
Температура	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Датчики температуры	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Вентиляторы	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).

Система визуализации	Рекомендуемое действие
Пределы визуализации	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Z Этапы и установка	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Частота ошибочных битов	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Регистрация проточной ячейки	Возможно, проточная ячейка установлена неправильно. - Выберите «Back» (назад) на экранах настройки прогона для возврата к этапу проточной ячейки. Откроется дверца отсека визуализации. - Извлеките и снова установите проточную ячейку, убедившись, что она установлена правильно.

Поступление реагентов	Рекомендуемое действие
Реакция клапанов	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Насос	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Буферный механизм	Обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).
Удаление израсходованных реагентов	Опорожните Резервуар для отходов (Waste bottle) и установите пустой контейнер.

Резервуар для отходов заполнен

Всегда начинайте прогон с пустым Резервуаром для отходов (Waste bottle). Если прогон был запущен без опорожнения Резервуара для отходов (Waste bottle) датчики системы запускают остановку программного обеспечения для остановки прогона, если резервуар полон. Датчики системы не могут остановить прогон во время определения кластеров, парноконцевого ресинтеза или автоматического промывания после прогона.

Во время паузы прогона открывается диалоговое окно с возможностью поднять системы подачи и опорожнить полный резервуар.

Опорожнение резервуара для отходов

1. Выберите «Raise Sippers» (поднять системы подачи).
2. Извлеките Резервуар для отходов (Waste bottle) и утилизируйте его содержимое соответствующим образом.
3. Установите пустой контейнер обратно в отсек для буфера.

Документ № 1000000009513 в. 07

для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

J

4. Выберите «**Continue**» (продолжить). Прогон возобновится автоматически.

Сообщение об ошибке RAID

Компьютер секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx оборудован четырьмя жесткими дисками, два для диагностического режима и два для исследовательского режима. При отказе жесткого диска система создает сообщение об ошибке RAID и предлагает обратиться в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina). Обычно требуется перенос жесткого диска.

Можно продолжить этапы настройки прогона и обычную работу. Цель сообщения - заранее запланировать обслуживание во избежание прерываний в нормальной работе прибора. Предупреждение RAID может подтвердить только администратор. Использование прибора только с одним жестким диском может привести к потере данных.

Ошибка сетевого хранилища

Ошибки сетевого хранилища возникают по одной из следующих причин:

- ▶ **Недостаточно места для хранения выходной папки** - Увеличьте объем пространства на устройстве хранения или переместите выходную папку в место с достаточным объемом памяти.
- ▶ **Не удастся подключиться к сетевому хранилищу** - Проверьте путь к выходной папке. См. раздел *Установка выходной папки по умолчанию на странице 19*.
- ▶ **Система не может записывать данные в сетевое хранилище** - обратитесь к своему ИТ-администратору для проверки разрешений.

Учетная запись Windows в операционной системе прибора требует разрешения на чтение и запись в папку вывода. Учетная запись Windows в диспетчере локальных запусков также требует разрешения на чтение и запись в папку вывода. См. раздел *Указание настройки учетных записей системных служб на странице 44*.

Установка настроек системы

Система настраивается при установке. Тем не менее, если требуется изменение или смена настроек системы, используйте функции настройки системы. Только у учетной записи администратора Windows есть права доступа к функциям настройки системы.

- ▶ **Настройки сети** - Функции настройки IP-адреса, адреса сервера доменных имен (DNS), имени компьютера и доменного имени.

Установка конфигурации сети

1. На экране «Manage Instrument» (управление прибором), выберите **System Configuration** (конфигурация системы).
2. Выберите «**Obtain an IP address automatically**» (автоматическое получение IP-адреса) для получения IP-адреса с использованием службы DHCP.

ПРИМЕЧАНИЕ

Протокол динамической настройки хостов (DHCP) - стандартный сетевой протокол 6 используемый в IP-сетях для динамического распределения параметров конфигурации сети.

Либо выберите «**Use the following IP address**» (использовать следующий IP-адрес) для подключения прибора к другому серверу вручную следующим образом. Обратитесь к администратору сети для получения адреса для вашего учреждения.

- ▶ Введите IP-адрес. IP-адрес представляет собой серию из 4 чисел, разделенных точкой, например 168.62.20.37.
 - ▶ Введите маску подсети, подраздел IP-сети.
 - ▶ Введите шлюз по умолчанию - маршрутизатор сети, через который осуществляется подключение к Интернет.
3. Выберите автоматическое получение адреса DNS-сервера для подключения прибора к серверу доменных имен, связанному с IP-адресом.

Либо выберите «**Use the following DNS server addresses**» (использовать следующие адреса DNS-сервера) для подключения прибора к серверу доменных имен вручную следующим образом.

- ▶ Введите требуемый адрес DNS. Адрес DNS - имя сервера, который используется для передачи доменных имен IP-адресам.
 - ▶ Введите альтернативный адрес DNS. Альтернативный адрес используется, если желаемый DNS не может передать конкретное доменное имя на IP-адрес.
4. Выберите «**Save**» для перехода к экрану компьютера.

ПРИМЕЧАНИЕ

Имя компьютера прибора присваивается компьютеру прибора при производстве. Любые изменения имени компьютера могут влиять на подключение и требуют сетевого администратора.

5. Подключите компьютер прибора к домену или рабочей группе следующим образом.
- ▶ **Для приборов, подключенных к Интернет** — Выберите «**Member of Domain**» (член домена), и затем введите доменное имя, связанное с подключением к Интернет в вашем учреждении. Изменения домена требуют имени пользователя и пароля администратора.
 - ▶ **Для приборов, не подключенных к Интернет** — Выберите «**Member of Work Group**» (член рабочей группы), и затем введите название рабочей группы. Название рабочей группы уникально для вашего учреждения.
6. Выберите «**Save**» (сохранить).

Приложение С Анализ в реальном времени

Обзор анализа в реальном времени	L
Рабочий процесс анализа в реальном времени	M

Обзор анализа в реальном времени

В секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используется реализация программного обеспечения анализа в реальном времени (RTA) RTA2. RTA2 работает на компьютере прибора и получает значения интенсивности на изображениях, выполняет распознавание оснований и присваивает оценку качества распознаванию оснований. RTA2 и операционное программное обеспечение общаются через сетевой интерфейс HTTP и общие файлы памяти. Если работа RTA2 прекращается, обработка не возобновляется и данные прогона не сохраняются.

Входные данные RTA2

RTA2 требует следующие входные данные для обработки:

- ▶ Изображения, содержащиеся в местной системной памяти.
- ▶ **RunInfo.xml**, который создается автоматически в начале прогона и предоставляет имя прогона, количество циклов, является ли считывание индексированным и количество клеток на проточной ячейке.
- ▶ **RTA.exe.config**, файл конфигурации программного обеспечения в формате XML.

RTA2 получает команды от операционного программного обеспечения о расположении файла **RunInfo.xml** и о том, указана ли дополнительная папка выходных данных.

Выходные файлы RTA2

Изображения для каждого канала **проходят** в память как клетки. Клетки - небольшие области изображений на проточной ячейке, определенные как поле зрения камеры. По данным изображениям программное обеспечение выдает ряд файлов распознавания оснований с оценкой качества и файлов фильтра. Все прочие файлы являются дополнительными выходными файлами.

Тип файла	Описание
Файлы распознавания оснований	Каждая анализируемая клетка включается в общий файл распознавания оснований (*.bcl.bgzf) для каждой дорожки и для каждого цикла. Общий файл распознавания оснований содержит распознавание оснований и соответствующие оценки качества для каждого кластера в данной дорожке.
Файлы фильтра	Каждая клетка дает информацию о фильтре, которая объединяется в 1 файл фильтра (*.filter) для каждой дорожки. В файле фильтра указано, прошел ли кластер через фильтры.
Файлы расположения кластера	Файлы расположения кластера (*.locs) содержат координаты X,Y для каждого кластера в клетке. Файл расположения кластера создается для каждой дорожки при создании шаблона.
Файлы индекса распознавания оснований	Файл индекса распознавания оснований (*.bci) создается для каждой дорожки для сохранения исходной информации клеток. Файл индекса содержит пару значений для каждой клетки, которые включают номер клетки и количество кластеров для данной клетки.

RTA2 предоставляет показатели в реальном времени для качества прогона, которые сохраняются как файлы InterOp. Файлы InterOp - бинарные выходные файлы, содержащие показатели клетки, цикла и считывания.

Обработка ошибок

RTA2 создает регистрационные файлы и записывает их в папку RTALogs. Ошибки записываются в файле ошибок в формате *.tsv.

Следующие файлы регистрации и ошибки передаются в окончательное расположение выходных данных в конце обработки:

- ▶ В файле *GlobalLog*.tsv приводятся важные события прогона.
- ▶ В файле *LaneNLog*.tsv перечислены события обработки для каждой дорожки.
- ▶ В файле *Error*.tsv перечислены ошибки, возникшие во время прогона.

Документ № 1000000009513 в. 07

для диагностики IN VITRO

M

- ▶ В файле *WarningLog*.tsv перечислены предупреждения, возникшие во время прогона.

Универсальный режим копирования

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx включает универсальный режим копирования. RTA2 запрашивает данный режим для копирования файлов из исходного расположения в целевое расположение, и служба обрабатывает запросы на копирование в порядке получения. Если возникает исключение, файл повторно помещается в очередь для копирования на основе количества файлов в очереди копирования.

Рабочий процесс анализа в реальном времени

Создание шаблона

Картирование расположений кластера

Регистрация и
извлечение
интенсивности

Запись расположения каждого кластера на проточной ячейке и определение значения интенсивности для каждого кластера.

Коррекция
фазирования

Коррекция эффектов фазирования и префазирования.

Распознавание
оснований

Определение распознавания оснований для каждого кластера.

Оценка качества

Присвоение оценки качества для каждого распознавания оснований.

Создание шаблона

Первый этап рабочего процесса RTA - создание шаблона, который определяет положение каждого кластера в клетке с использованием координат X и Y.

Создание шаблона требует данных изображений первых 5 циклов прогона. После получения изображения последнего цикла шаблона в клетке, создается шаблон.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для определения кластера при создании шаблона должно быть, как минимум 1 основание помимо гуанина в течение первых 5 циклов. Для любых индексных последовательностей RTA2 требуется как минимум 1 основание помимо гуанина в течение первых 2 циклов.

Шаблон используется как контроль для последующего этапа регистрации и извлечения интенсивности. Положения кластеров для всей проточной ячейки записываются в файлы расположения кластеров (*.locs), по 1 файлу для каждой дорожки.

Регистрация и извлечение интенсивности

Регистрация и извлечение интенсивности начинаются после создания шаблона.

- ▶ При регистрации производится совмещение с шаблоном изображений, полученных при каждом последующем цикле получения изображений.
- ▶ При извлечении интенсивности определяется значение интенсивности для каждого кластера в шаблоне для данного изображения.

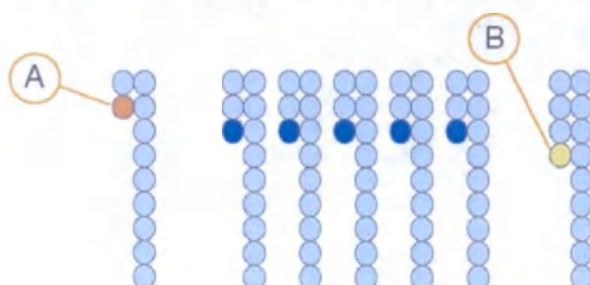
Если выполнение регистрации невозможно для любых изображений в цикле, распознавания оснований для данной клетки в данном цикле не создается.

Коррекция фазирования

При реакции секвенирования каждая нить ДНК в кластере удлиняется на 1 основание в каждом цикле. Фазирование и префазирование осуществляются, когда нить выходит из фазы в текущем цикле включения.

- ▶ Фазирование возникает, если основание размещается позади.
- ▶ Префазирование возникает, если основание размещается впереди.

Рисунок 24. Фазирование и префазирование



- A. Считывание с основанием в фазировании
- B. Считывание с основанием в префазировании

RTA2 выполняет коррекцию эффектов фазирования и префазирования, что повышает качество данных в каждом цикле во время прогона.

Распознавание оснований

Распознавание оснований определяет основание (аденин, цитозин, гуанин или тимин) для каждого кластера в данной клетке в конкретном цикле. В секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используется 2-канальное секвенирование, для которого требуется только 2 изображения для кодирования данных для 4 оснований ДНК, 1 для красного канала и 1 для зеленого канала.

Значения интенсивности, полученные при сравнении изображения с другим изображением, дают 4 отдельных популяции, каждая из которых соответствует нуклеотиду. Процесс распознавания оснований определяет, к какой популяции относится каждый кластер.

Рисунок 25. Визуальное представление значений интенсивности кластеров

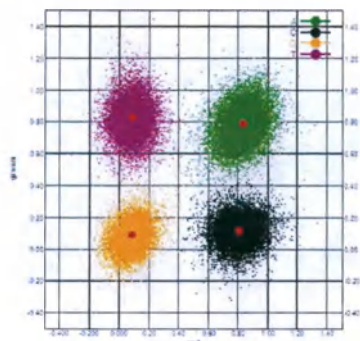


Таблица 1. Распознавание оснований при 2-канальном секвенировании

Основание	Красный канал	Зеленый канал	Результат
A	1 (вкл.)	1 (вкл.)	Кластеры, для которых наблюдается интенсивность в красном и зеленом каналах.
C	1 (вкл.)	0 (откл.)	Кластеры, для которых наблюдается интенсивность только в красном канале.
G	0 (откл.)	0 (откл.)	Кластеры, для которых наблюдается отсутствие интенсивности в известном расположении кластера.
T	0 (откл.)	1 (вкл.)	Кластеры, для которых наблюдается интенсивность только в зеленом канале.

Кластеры, прошедшие фильтр

В течение прогона RTA2 фильтрует необработанные данные для удаления считываний,

Документ № 1000000009513 в. 07

для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

О

не соответствующих порогу качества данных. Перекрывающиеся кластеры и кластеры низкого качества удаляются.

При 2-канальном анализе RTA2 использует популяционную систему для определения строгости распознавания оснований. Кластеры проходят фильтр (PF), если не более 1 распознавания оснований в первых 25 циклах значение строгости составляет $<0,63$. Для кластеров, не прошедших фильтр, распознавания оснований не выполняется.

Индексирование

Процесс распознавания оснований для индексных считываний отличается от распознавания оснований при других считываниях.

Индексные считывания должны начинаться с как минимум 1 основания помимо гуанина в любом из первых 2 циклов. Если индексное считывание начинается с 2 распознаваний оснований гуанина, интенсивности сигнала не создается. Сигнал должен присутствовать в любом из первых 2 циклов для обеспечения функции демультиплексирования.

Для повышения надежности демультиплексирования, выбирайте индексные последовательности, которые дают сигнал как минимум в 1 канале, желательно в обоих каналах для каждого цикла. Соблюдение данного правила позволяет избежать индексных комбинаций, при которых в любом цикле будут получены только гуаниновые основания.

- ▶ Красный канал - аденин или цитозин
- ▶ Зеленый канал - аденин или тимин

Данный процесс распознавания оснований обеспечивает точность при анализе образцов с низким совпадением.

Оценка качества

Оценка качества, или Q-score, — прогнозирование вероятности неправильного определения оснований. Более высокая оценка качества показывает, что определение оснований более высокого качества и с большей вероятностью будет верным.

Оценка качества - простой способ сообщений о вероятности мелких ошибок. Оценки качества представлены в формате Q(X), где X — оценка. В следующей таблице показана взаимосвязь между оценкой качества и вероятностью ошибки.

Оценка качества Q(X)	Вероятность ошибки
Q40	0,0001 (1 на 10 000)
Q30	0,001 (1 на 1 000)
Q20	0,01 (1 на 100)
Q10	0,1 (1 на 10)

ПРИМЕЧАНИЕ

Оценка качества основана на измененной версии алгоритма Phred.

Оценка качества рассчитывает ряд прогностических факторов для каждого распознавания оснований и затем использует значения прогностических факторов для определения оценки качества по таблице качества. Таблицы качества создаются для предоставления оптимально точных прогностических факторов для прогонов, созданных с определенной настройкой платформы секвенирования и версии химических процессов. После определения оценки качества результаты записываются в файлах распознавания оснований (*.bcl.bgzf).

Приложение D Файлы и папки выходных данных

Выходные файлы секвенирования	P
Структура папки выходных данных	R

Выходные файлы секвенирования

Тип файла	Описание, расположение и название файла
Файлы распознавания оснований	Каждая анализируемая клетка включается в файл распознавания оснований, которые объединяются в 1 файл для каждой дорожки для каждого цикла. Общий файл содержит распознавание оснований и кодированные оценки качества для каждого кластера в данной дорожке. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Файлы хранятся в 1 папке для каждой дорожки. [Cycle].bcl.bgzf , где [Cycle] представляет 4-значный номер цикла. Файлы распознавания оснований сжимаются с использованием блокового сжатия gzip.
Файл индекса распознавания оснований	Для каждой дорожки создается бинарный файл индекса, в котором указывается исходная информация о клетке в виде пары значений для каждой клетки, которые включают номер клетки и количество кластеров для данной клетки. Файлы индекса распознавания оснований создаются при первом создании файла распознавания оснований для данной дорожки. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Файлы хранятся в 1 папке для каждой дорожки. s [Lane].bci
Файлы расположения кластера	Для каждой клетки координаты XY каждого кластера объединяются в 1 файл расположения кластера для каждой дорожки. Файлы расположения кластера создаются при создании шаблона. Data\Intensities\L00[X] — Файлы хранятся в 1 папке для каждой дорожки. s [lane].locs
Файлы фильтра	В файлах фильтра указано, прошли ли кластеры фильтры. Информация фильтра объединяется в 1 файл фильтра для каждой дорожки и считывания. Файлы фильтра создаются в цикле 26 с использованием 25 циклов данных. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Файлы хранятся в 1 папке для каждой дорожки. s [lane].filter
Файлы InterOp	Бинарные файлы отчета. Файлы InterOp обновляются в течение прогона. Папка InterOp
Файл настройки RTA	Файл настройки RTA создается в начале прогона и содержит установки для прогона. [корневая папка].RTAConfiguration.xml
Файл информации о прогоне	Содержит название прогона, количество циклов в каждом считывании, является ли считывание индексированным, и количество полос и клеток на проточной ячейке. Файл информации о прогоне создается в начале прогона. [Корневая папка].RunInfo.xml

Клетки проточной ячейки

Клетки - небольшие области изображений на проточной ячейке, определенные как поле зрения камеры. Общее количество клеток зависит от количества дорожек, полос и поверхностей, для которых выполняются изображения на проточной ячейке, и от того, как камеры взаимодействуют при получении изображений. В высокопроизводительных проточных ячейках имеется в общей сложности 864 клеток.

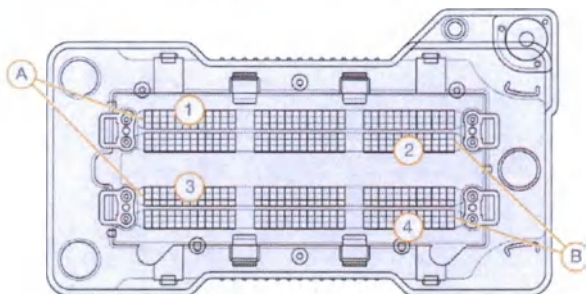
Таблица 2. Клетки проточной ячейки

Компонент проточной ячейки	Высокая производительность	Описание
Строки	4	Дорожка - физический канал, который разделяет порты входа и выхода.
Поверхности	2	Изображения проточной ячейки выполняются на 2 поверхностях, верхней и нижней. Выполняется изображение верхней поверхности 1 клетки, затем выполняется изображение нижней поверхности той же клетки перед перемещением к следующей клетке.
Полос на дорожку	3	Колонка - колонка клеток в дорожке.
Сегменты камеры	3	В приборе используется 6 камер для получения изображений проточной ячейки в 3 сегментах в каждой дорожке.
Клеток на колонку на сегмент камеры	12	Клетка - область проточной ячейки, которая рассматривается камерой как 1 изображение.
Общее количество клеток, для которых	864	Общее количество клеток равняется количеству дорожек × количество поверхностей × количество полос × количество сегментов камеры × количество клеток на полосу на сегмент.

Нумерация дорожек

Для дорожек 1 и 3, называемых парой дорожек А, изображения выполняются одновременно. Для дорожек 2 и 4, называемых парой дорожек В, изображения выполняются после получения изображений пары дорожек А.

Рисунок 26. Нумерация дорожек



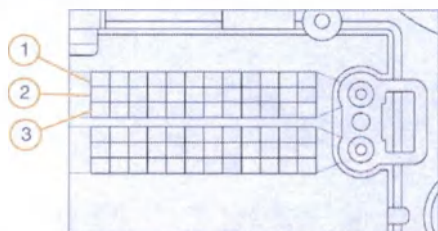
А. Пара дорожек А — дорожки 1 и 3

В. Пара дорожек В — дорожки 2 и 4

Нумерация колонок

Для каждой дорожки изображения выполняются в 3 полосах. Полосы проточных ячеек высокой производительности нумеруются от 1 до 3.

Рисунок 27. Нумерация колонок

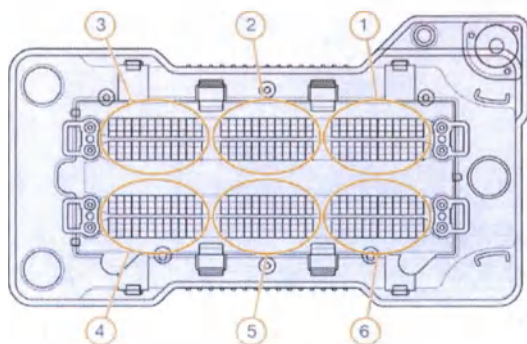


Нумерация камер

В секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используется 6 камер для получения изображений проточной ячейки.

Камеры нумерованы от 1 до 6. Камеры 1-3 выполняют изображения дорожки 1. Камеры 4-6 выполняют изображения дорожки 3. После получения изображений дорожек 1 и 3, модуль получения изображений перемещается по оси X для получения изображений дорожек 2 и 4.

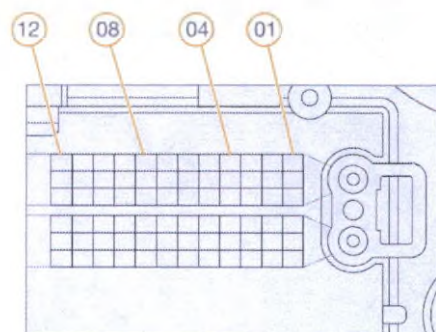
Рисунок 28. Нумерация камер и сегментов (показана высокопроизводительная проточная ячейка)



Нумерация клеток

В каждой колонке каждого сегмента камеры имеется 12 клеток. Клетки нумеруются от 01 до 12 вне зависимости от номера колонки или сегмента камеры и представлены 2-значными числами.

Рисунок 29. Нумерация клеток



Полный номер клетки включает 5 цифр, представляющих ее расположение, следующим образом:

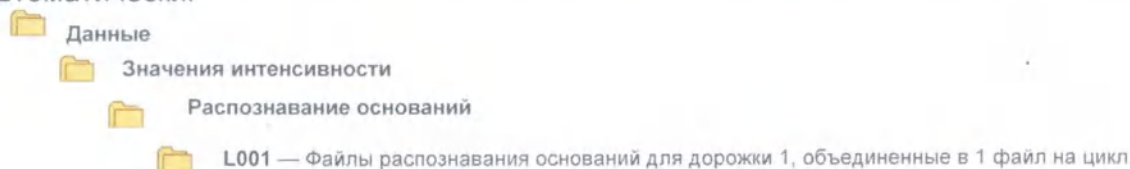
- ▶ **Поверхность** — 1 представляет верхнюю поверхность; 2 представляет нижнюю поверхность
- ▶ **Колонка** — 1, 2 или 3
- ▶ **Камера** — 1, 2, 3, 4, 5 или 6
- ▶ **Клетка** — 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 или 12

Пример: Клетка номер 12508 обозначает верхнюю поверхность, колонку 2, камеру 5 и клетку 8.

Полный 5-значный номер колонки используется в имени файла миниатюр изображений и в эмпирических файлах фазирования. Дополнительная информация приводится в разделе *Выходные файлы секвенирования на странице 57*.

Структура папки выходных данных

Операционное программное обеспечение создает названия папок выходных данных автоматически.



-  **L002** — Файлы распознавания оснований для дорожки 2, объединенные в 1 файл на цикл
-  **L003** — Файлы распознавания оснований для дорожки 3, объединенные в 1 файл на цикл
-  **L004** — Файлы распознавания оснований для дорожки 4, объединенные в 1 файл на цикл

-  **L001** — Общий файл *. locs для дорожки 1.
-  **L002** — Общий файл *. locs для дорожки 2.
-  **L003** — Общий файл *. locs для дорожки 3.
-  **L004** — Общий файл *. locs для дорожки 4.

-  **Изображений**
 -  **Фокус**
 -  **L001** — Фокус изображений для дорожки 1.*
 -  **L002** — Фокус изображений для дорожки 2.
 -  **L003** — Фокус изображений для дорожки 3.
 -  **L004** — Фокус изображений для дорожки 4.

-  **InterOp** — Бинарные файлы.
-  **Logs**—Файлы регистрации, описывающие этапы операции.
-  **Recipe** — Специфичный для прогона файл, название которого включает код картриджа с реагентами
-  **RTALogs** — Регистрационные файлы, описывающие этапы анализа.

-  RTAComplete.txt
-  RTAConfiguration.xml
-  RunInfo.xml
-  RunParameters.xml

Индекс

А

административные настройки и задачи А
воздушный фильтр 3, 37
анализ
файлы выходных данных Q
повторный анализ 31
просмотр результатов 29
анализ, чистота первичного сигнала Р
аудио 17
экспорт журналов регистрации событий F
фильтр Е
пиктограммы F
просмотр Е

В

расположение резервного копирования D
файлы распознавания оснований Q
распознавание оснований О
индексирование Р
картридж с буфером 6, 26
буферный отсек 2

С

нумерация камеры R
фильтр строгости Р
создание кластера 20, 29
файлы расположения кластера Q
создание шаблона N
кластеры, прошедшие фильтр Р
совместимость
проточная ячейка, картридж с реагентами 4
Отслеживание RFID 4-5
компоненты
буферный отсек 2
отсек визуализации 2
отсек для реагентов 2
строка состояния 2
настройки конфигурации K
наборы реагентов 4
картридж с буфером 6
проточная ячейка 4
обслуживание прибора 7
лабораторная вода 7
картридж с реагентами 5
прогоны секвенирования 6
расходные материалы для промывания 34-35
программное обеспечение управления 8
создание прогона 21
поддержка клиентов Y
количество циклов в считывании 20

D

данные
период резервного копирования D
передача данных
универсальный режим копирования N
удаление пользователя C

проверка пространства на диске 8
документация 1, Y

E

эмпирическое фазирование N
вероятность ошибки Р
ошибки и предупреждения 8, M

F

файлы фильтра Q
проточная ячейка
штифты совмещения 23
очистка 22 получение изображений R
нумерация дорожек R
пары дорожек 4
обзор 4
упаковка 22
номер колонки R
нумерация клеток S клетки Q
формаид, положение 6 27

H

помощь
документация 1
помощь, техническая Y

I

пиктограммы
журналы регистрации событий F
ошибки и предупреждения 8
Местный диспетчер прогонов 11
сворачивание NOS 9
статус 8
длительность ожидания при отсутствии активности C
Служба проактивного мониторинга «Иллюмина» (Illumina) 18
отсек визуализации 2
изображения, 2-канальное секвенирование O
индексирование Р
изображение прибора 17
настройки конфигурации K
указатели режима 17
название 17
данные производительности 18
кнопка питания 3
перезагрузка 18 повторный запуск 18-19
выключение 18-19
включение 16
расходные материалы для обслуживания прибора 7
промывание прибора 34
значения интенсивности O
Файлы InterOp I, Q

K

клавиатура 17

L

U

руководства по воде лабораторного класса чистоты 7
 нумерация дорожек R
 пары дорожек R
 Местный диспетчер прогонов
 создание прогона 21
 пиктограммы 11
 настройки модуля D
 пароли пользователей 14
 просмотр 10-11
 рабочий процесс 11
 файлы locs Q

M

настройки обслуживания D
 обслуживание, профилактическое 34
 управление прибором, отключение 19
 показатели
 распознавание оснований O
 циклы плотности кластеров 29
 циклы интенсивности 29
 моя учетная запись 15

N

ошибка сетевого хранилища 51

O

обучение онлайн 1
 файлы выходных данных Q
 файлы выходных данных, секвенирование Q

P

прохождение фильтра (PF) P
 пароль
 доступное количество попыток C
 изменение 15
 создание B
 истечение C
 управление A
 сброс B
 состояния 15
 разблокирование B
 пароли пользователя 14
 фазирование, префазирование N
 Алгоритм Phred P
 промывание после прогона 32
 кнопка питания 3, 16
 переключатель питания 16
 проверка перед прогоном 27
 ошибки перед прогоном I
 профилактическое обслуживание 34

Q

Оценки качества P

R

Сообщение об ошибке RAID K
 длина считывания 20-21
 картридж с реагентами
 обзор 5

емкость №28 35
 емкость №6 27
 отсек для реагентов 2
 реагенты в наборах 4
 надлежащая утилизация 26
 Программное обеспечение анализа в реальном времени 8
 фазирование N
 результаты Q
 рабочий процесс N
 перезагрузка
 прибор 18-19
 исследовательский режим 18
 перезагрузка в исследовательский режим 17
 удаление неактивных папок D
 повторный анализ 31
 повторный запуск 18-19
 Отслеживание RFID 4
 длительность прогона 20-21
 папка прогона
 изменение расположения 32
 удаление 14
 повторное подключение 14
 установка расположения 18
 показатели прогона 28
 RunInfo.xml I, Q, Q
 прогоны
 активный 12
 создание 21
 редактирование 13
 фильтр 13
 сккрытие 13
 штифт 14
 ход выполнения 28
 Вкладка обзора прогона 30
 поиск 13
 установка запуска 18
 Режим RUO 17-18

S

образцы
 вкладка образцов и результатов 30
 поиск 13
 секвенирование
 введение 20
 поставляемые пользователем расходные материалы 6
 секвенирование в течение анализа 10
 вкладка информации о секвенировании 30
 рабочий процесс секвенирования 21, N
 настройки учетной записи обслуживания D
 отключение прибора 19
 гипохлорит натрия, промывание 35
 программное обеспечение
 настройки конфигурации K
 создание прогона 21
 проверка пространства на диске 8
 анализ изображения, распознавание оснований 8
 инициализация 16

на приборе 8
длительность прогона 20-21
резервуар для отходов заполнен J
утилизация 24, 36
предупреждения о статусе 8
строка состояния 2
нумерация колонки R
проверка системы G
настройки системы 17, C
время ожидания системы C
системные имя пользователя и пароль 16

T

техническая поддержка Y
создание шаблона N, N
нумерация клеток S
устранение неисправностей, проверка перед
прогоном I
файлы прогона I, I
контейнер для израсходованных реагентов J
проверка системы G

U

Универсальный режим копирования N
поставляемые пользователем расходные
материалы 6-7
управление пользователями A

имя пользователя и пароль 16
изменение прав допуска пользователя C
удаление C

W

промывание
автоматическое 32
промывание вручную 34
поставляемые пользователем расходные
материалы 34
компоненты промывания 34
Доступ к Windows 9
выход 19
рабочий процесс
картридж с буфером 26
проточная ячейка 23
подготовка проточной ячейки 22
индексирование P
обзор 21
проверка перед прогоном 27
картридж с реагентами 26
длительность прогона 20-21
показатели прогона 28
секвенирование N
гипохлорит натрия 35
израсходованные реагенты 24

Техническая поддержка

Для получения технической поддержки обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina).

Веб-сайт: www.illumina.com

Электронная почта: techsupport@illumina.com

Номера телефонов технической поддержки компании «Иллюмина» (Illumina)

Регион	Бесплатный номер телефона	Региональный номер
Северная Америка	+1.800.809.4566	
Австралия	+1.800.775.688	
Австрия	+43 800006249	+43 19286540
Бельгия	+32 80077160	+32 34002973
Китай	400.066.5835	
Дания	+45 80820183	+45 89871156
Финляндия	+358 800918363	+358 974790110
Франция	+33 805102193	+33170770446
Германия	+49 8001014940	+49 8938035677
Гонконг, Китай	800960230	
Ирландия	+3531800936608	+353016950506
Италия	+39 800985513	+39 236003759
Япония	0800.111.5011	
Нидерланды	+31 8000222493	+31 207132960
Новая Зеландия	0800.451.650	
Норвегия	+47 800 16836	+47 21939693
Сингапур	+1.800.579.2745	
Южная Корея	+82 80 234 5300	
Испания	+34 911899417	+34 800300143
Швеция	+46 850619671	+46 200883979
Швейцария	+41 565800000	+41 800200442
Тайвань, Китай	00806651752	
Великобритания	+44 8000126019	+44 2073057197
Прочие страны	+44.1799.534000	

Паспорта безопасности (SDS) доступны на веб-сайте компании «Иллюмина» (Illumina) по ссылке support.illumina.com/sds.html.

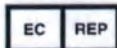
Документация по продукту доступна для загрузки по ссылке support.illumina.com.

Данное руководство справочное предназначено для Российской Федерации (РФ) и незначительно отличается от руководства справочного для Соединенных Штатов Америки (США), различия не затрагивают назначение и принципов процедуры медицинского изделия



Illumina
5200 Illumina Way
Сан-Диего, Калифорния, 92122, США
+ 1.800.809.ILMN (4566)
+ 1.858.202.4566 (вне Северной Америки)
techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Steenhoven 19, 5626 DK, Eindhoven,
The Netherlands (Нидерланды)

Австралийский спонсор
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Австралия

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

© 2021 Illumina, Inc. Все права защищены.

illumina

Перевод с английского языка на русский язык

/Большая печать штата Мэриленд/

Штат Мэриленд

Канцелярия секретаря штата

Настоящий апостиль недействителен для использования в Соединенных Штатах Америки, на территориях и во владениях, принадлежащих данному государству.

Настоящий апостиль не удостоверяет содержание документа, в отношении которого он выдан.

Apostille (Апостиль)

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961 (Гаагская конвенция от 5 октября 1961 г.))

1. Страна: Соединенные Штаты Америки
Настоящий официальный документ
2. Подписан Скоттом А. Поьером (Scott A. Poyer)
3. Выступающим в качестве секретаря Окружного суда
4. Скреплен печатью/штампом секретаря Окружного суда округа Анн-Арандел

Удостоверено

5. В г. Аннаполисе, штат Мэриленд
6. **22 сентября 2022 г.**
7. Секретарем штата Мэриленд
8. За № 613661
9. Место печати:

**/Печать/: ПЕЧАТЬ КАНЦЕЛЯРИИ
СЕКРЕТАРЯ ШТАТА * МЭРИЛЕНД**

10. Подпись:

/Подпись/

Секретарь штата

Штат Мэриленд, округ Анн-Арандел

Я, СКОТТ А. ПОЙЕР, секретарь Окружного суда округа Анн-Арандел, штат Мэриленд, который является судом письменного производства, настоящим подтверждаю, что **Ахмад Миски** является должным образом назначенным, уполномоченным и квалифицированным нотариусом, действующим с 10 мая 2021 г.

В подтверждение вышеизложенного я собственноручно подписал и скрепил печатью суда настоящий документ 22 сентября 2022 г.

/Подпись/

**Скотт А. Пойер, секретарь
Окружной суд округа Анн-Арандел, штат Мэриленд**

/Печать/: **ОКРУЖНОЙ СУД ОКРУГА АНН-АРАНДЕЛ * ШТАТ
МЭРИЛЕНД**

/Логотип/: «Иллюмина, Инк.»

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)

/Штамп/: Настоящим я, Ханади Аджами, подтверждаю, что данный документ является оригиналом. *
/Подпись/ * Штат Мэриленд, округ Анн-Арандел * Подписано Ханади Аджами под присягой в моем
присутствии. * Ахмад Миски * Нотариус /Подпись/ * 22 сентября 2022 г. * Срок действия полномочий
истекает 28 мая 2025 г.

/Печать/: ШТАТ МЭРИЛЕНД * ОКРУГ АНН-АРАНДЕЛ * НОТАРИУС * АХМАД МИСКИ

Руководство справочное

Производитель:

«Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.)

Адрес:

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200
Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

/Штамп/: ЛИВАЙ П. ХОУП *
Нотариус, штат Калифорния *
Округ Сан-Диего *
Лицензия № 2377029 *
Срок действия полномочий
истекает 30 сентября 2025 года

От имени компании «Иллюмина, Инк.»

/Подпись/

Дата 22 сентября 2022 г.

Аурелия Браунридж (Aurelia
Brownridge),
старший специалист отдела по
вопросам нормативно-
правового регулирования
«Иллюмина, Инк.»

**ОФИЦИАЛЬНОЕ ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНИЕ
ШТАТА КАЛИФОРНИЯ**

§ 1189 ГРАЖДАНСКОГО КОДЕКСА

Нотариус или другое должностное лицо, заполнившее настоящее свидетельство, удостоверяет только личность лица, подписавшего документ, к которому приложено настоящее свидетельство, а не достоверность, правильность или действительность указанного документа.

Штат Калифорния
Округ САН-ДИЕГО

22.09.2022

Дата

ко мне, ЛИБАЮ П. ХОУП, НОТАРИУСУ

Указать имя, фамилию и должность официального лица

лично явилась

АУРЕЛИЯ БРАУНРИДЖ (AURELIA BROWNRIDGE)

Имя, фамилия лица, подписавшего документ

которая представила мне убедительные доказательства того, что она является лицом, чье имя указано в прилагаемом документе, и заверила меня, что имеет полномочия выступать в данном качестве и что путем проставления ее подписи в прилагаемом документе физическое или юридическое лицо, от имени которого она выступает, считается подписавшим такой документ.

/Штамп/: ЛИБАЙ П. ХОУП *
Нотариус, штат Калифорния *

Округ Сан-Диего *

Лицензия № 2377829 *

Срок действия полномочий истекает 30 сентября 2025 года

Будучи предупрежденным о НАКАЗАНИИ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ в соответствии с законами штата Калифорния, я удостоверяю, что информация в вышеприведенном разделе является правильной и точной.

ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНО моей подписью и официальной печатью.

Подпись: /Подпись/

Место печати и (или) штампа нотариуса

Подпись нотариуса

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Заполнение информации в данном разделе может предотвратить внесение изменений в документ или неправомерное присоединение данной формы к другому документу.

Описание приложенного документа

Название или тип документа: РУКОВОДСТВО СПРАВОЧНОЕ

Дата документа:

Количество страниц:

Подписавшие документ лица, не указанные выше:

Полномочия, заявленные лицами, подписавшими документ

Имя, фамилия лица, подписавшего документ:

☐ Должностное лицо компании, должность:

☐ Партнер: – ☐ с ☐ полный

ограниченной
ответственностью

☐ Физическое лицо

☐ Лицо, действующее по
доверенности

☐ Доверительный
управляющий

☐ Другое:

Лицо, подписавшее документ, представляет:

Имя, фамилия лица, подписавшего документ:

☐ Должностное лицо компании, должность:

☐ Партнер: – ☐ с ☐ полный

ограниченной
ответственностью

☐ Физическое лицо

☐ Лицо, действующее по
доверенности

☐ Доверительный
управляющий

☐ Другое:

Лицо, подписавшее документ, представляет:

©2019 г. Национальная ассоциация нотариусов



/Надпись на наклейке/: Россия. 208592

Перевод данного текста выполнен мной, переводчиком Тумановым Владимиром Олеговичем.

Российская Федерация

Город Москва

Семнадцатого октября две тысячи двадцать второго года.

Я, Якубова Татьяна Олеговна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Туманова Владимира Олеговича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

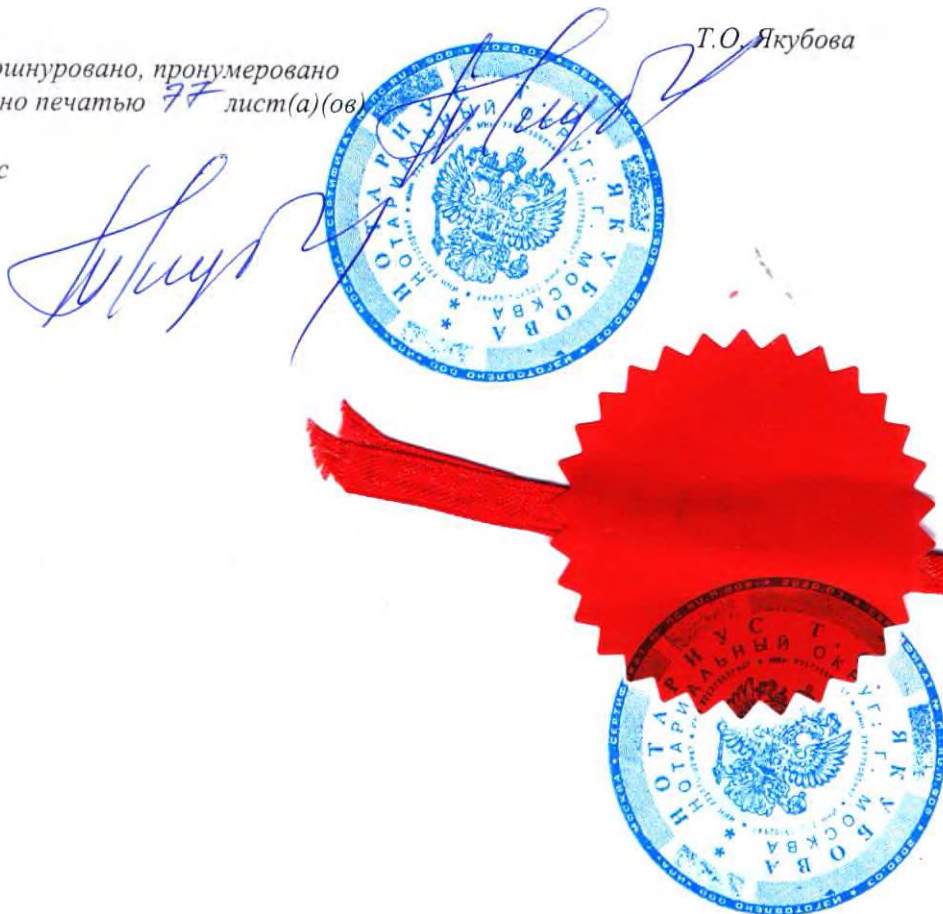
Зарегистрировано в реестре: № 77/2171-н/77-2022- 51-184

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 77 лист(а)(ов)

Т.О. Якубова

Нотариус



Sequencer nucleic acids NextSeq™ 550Dx, a new generation sequencing method (NGS)

I, Hanadi Ajami, hereby certify
that this is an original document.



263676

State of Maryland, Anne Arundel County, Sect.

I, **SCOTT A. POYER**, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that **Ahmad Miski** was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 10th day of May, 2021.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the court September 22, 2022

Scott A. Poyer

Scott A. Poyer, Clerk
Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland



Sequencer nucleic acids NextSeq™ 550Dx, a new generation sequencing method (NGS)

I, Hanadi Ajami, hereby certify that this is an original document.


State of Maryland, Anne Arundel County
Subscribed and Sworn to before me by
Hanadi Ajami.
Ahmad Miski
Notary Public
SEP 22 2022
My Commission expires on May 28, 2025



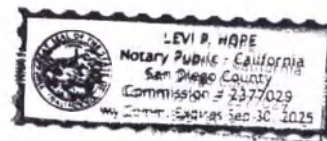
Addendum for User Manual

Manufacturer:

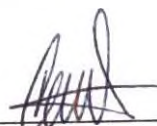
Illumina, Inc

Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA



On behalf of Illumina, Inc.


Aurelia Brownridge
Sr. Regulatory Affairs Specialist

Date September 22, 2022

CALIFORNIA ACKNOWLEDGMENT

CIVIL CODE § 1189

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California

County of SAN DIEGO

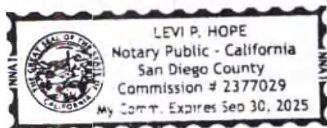
On _____ before me, LEVI P HOPE, NOTARY PUBLIC
Date Here Insert Name and Title of the Officer

personally appeared AURELIA BROWNRIDGE
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person~~s~~ whose name~~s~~(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he~~s~~/she~~s~~/they executed the same in his~~s~~/her~~s~~/their authorized capacity~~(ies)~~, and that by his~~s~~/her~~s~~/their signature~~s~~ on the instrument the person~~s~~, or the entity upon behalf of which the person~~s~~ acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.



Signature

Levi Hope

Signature of Notary Public

Place Notary Seal and/or Stamp Above

OPTIONAL

Completing this information can deter alteration of the document or fraudulent reattachment of this form to an unintended document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: ADDENDUM FOR USER MANUAL

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer – Title(s): _____

☐ Partner – ☐ Limited ☐ General

☐ Individual ☐ Attorney in Fact

☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer – Title(s): _____

☐ Partner – ☐ Limited ☐ General

☐ Individual ☐ Attorney in Fact

☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

1. Назначение медицинского изделия

1.1 Наименование медицинского изделия

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS).

(далее секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, секвенатор NextSeq 550Dx, прибор NextSeq 550Dx, NextSeq 550Dx, прибор, или система).

1.2 Полное наименование медицинского изделия

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS).

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS), в составе:

1. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS) – 1 шт.
2. Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) – 1 шт.
3. Резервуар для отходов (Waste bottle) – 1 шт.
4. Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) – 1 шт.
5. Адаптер для сканирования биочипов (Beadchip Adapter) – 1 шт.
6. Ячейка проточная, тестовая (Wash flow cell) – 1 шт.
7. Кабель локальной сети (Ethernet Cable) – 1 шт.
8. Комплект беспроводной клавиатуры и мыши (Wireless keyboard with non-integrated mouse) – 1 шт.
9. Кабель питания (Power Cord) – 1 шт.
10. Руководство по распаковке – 1 шт.
11. Листовка информационная – 1 шт.
12. Руководство по эксплуатации – 1 шт.
13. Руководство справочное – 1 шт.
14. Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager, модуль анализа герминальных вариантов – 1 шт.
15. Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager, модуль анализа соматических вариантов – 1 шт.
16. Руководство по установке – 1 шт.
17. Руководство по безопасности и нормативно-правовому соответствию – 1 шт.
18. Руководство по нормативно-правовому соответствию считывающего устройства RFID – 1 шт.
19. Листок – вкладыш с расшифровкой символов – 1 шт.
20. Листок – вкладыш для клиента – 1 шт.
21. Фильтр воздушный (Air filter) – не более 100 шт. (при необходимости).
22. Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon (TruSeq™ Custom Amplicon Filter Plate) – не более 100 шт. (при необходимости).
23. Набор адаптеров для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture Kit), 2 шт./набор – не более 100 шт. (при необходимости).
24. Комплект функциональных штативов для плашки и адаптеров для центрифугирования TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture & Collar Kit) – не более 100 шт. (при необходимости), в составе:
 1. Адаптер для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture) – 2 шт.

2. Рамка-переходник для центрифугирования фильтр-планшета (Adapter Collar for Centrifugation) – 2 шт.
25. Крышки запасные для индексных адаптеров (Index Adapter Replacement Caps), 2 шт./уп. – не более 100 шт. (при необходимости).

1.3 Назначение

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS) предназначен для секвенирования библиотек ДНК при использовании наборов реагентов для диагностики in vitro. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используется с наборами реагентов: "Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот" и "Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот" при использовании с медицинскими изделиями, такими как: "Набор для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения", "Система неинвазивного пренатального тестирования для определения множественных врожденных анеуплоидий ИВД VeriSeq™ NIPT Solution v2, анализ нуклеиновых кислот, в вариантах исполнения" и аналитическим программным обеспечением.

1.4 Показания

Только для диагностики in vitro.

1.5 Область применения

Клиническая лабораторная диагностика.

1.6 Противопоказания

Не применимо

1.7 Побочные эффекты

Не применимо

1.8 Информация о предполагаемых пользователях медицинского изделия

Специалисты, имеющие квалификацию в области клинической лабораторной диагностики. Только для профессионального применения.

2. Информация о производителе/разработчике медицинского изделия

2.1 Информация о производителе (изготовителе) и разработчике медицинского изделия

«Иллюмина, Инк.», 5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (Illumina, Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA), тел. 1.858.202.4500

2.2 Информация о месте(-ах) производства медицинского изделия

«Иллюмина Сингапур», 29 Вудландс Индастриал Парк, Е1, НорпТек, Сингапур 757716 (Illumina Singapore Pte Ltd 29 Woodlands Industrial Park E1, Northtech Singapore 757716)

3. Классификация медицинских изделий

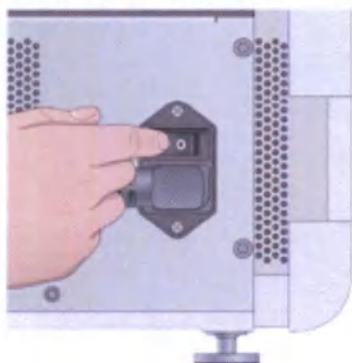
Классификация	Согласно требованиям действующих директив ЕС
GMDN, UMDNS или EDMA (Всемирная номенклатура медицинских изделий, универсальная система классификации медицинских приборов или классификация Европейской ассоциации производителей диагностического оборудования)	GMDN: 61957 - Анализатор последовательностей нуклеиновых кислот IVD, секвенирование нового поколения (NGS)
Класс потенциального риска	2a
Класс электробезопасности	1
Класс лазера:	1
Уровни радиации	Уровни радиации, создаваемые устройствами 1 класса, не являются опасными.
Класс безопасности программного обеспечения	Умеренное / 62304 Класс B
Существенная степень защиты согласно IEC 60529	Н/П Прибор не используется в условиях, требующих специальной защиты.
Класс по возможным последствиям отказа в процессе использования (ГОСТ Р 50444-92)	Г - изделия, отказ которых не вызывает нарушения основных функций, а приводит только к изменению дополнительных характеристик, не вызывающих последствий для пациента.

4. Инструкция по применению

4.1 Запуск прибора

Установите переключатель питания в положение «I» (вкл.).

Рисунок 1. Переключатель питания, расположенный на задней панели прибора



Нажмите на кнопку питания над отсеком для реагентов. Кнопка питания включает питание прибора и запускает встроенный компьютер и программное обеспечение.

Рисунок 2. Кнопка питания, расположенная на передней панели прибора



Дождитесь завершения загрузки операционной системы. Операционное программное обеспечение NextSeq 550Dx (NOS) запускается и инициализирует систему автоматически. После завершения этапа инициализации открывается домашний экран.

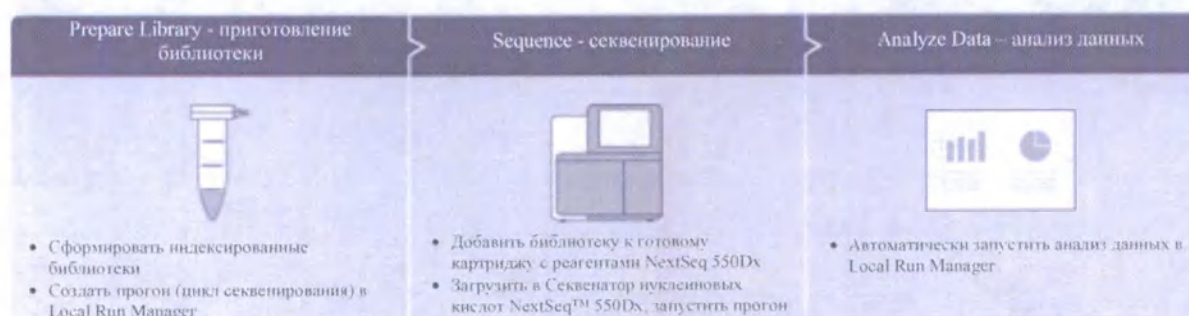
Введите имя пользователя и пароль для местного диспетчера прогонов. Информация о паролях приводится в разделе *Пароли пользователя* в справочном руководстве NextSeq 550Dx. Информация по настройке учетной записи в местном диспетчере прогонов приводится в разделе *Введение* в справочном руководстве NextSeq 550Dx.

Выберите «**Login**» (Вход). Откроется главный экран с пиктограммами «**Sequence**» (секвенирование), «**Local Run Manager**» (местный диспетчер прогонов), «**Manage Instrument**» (управление прибором) и «**Perform Wash**» (выполнить промывку).

4.2 Секвенирование

Аналитический цикл секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx включает три этапа: приготовление библиотеки, секвенирование и анализ данных (Рисунок 3).

Рисунок 3. Три этапа процесса анализа на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx



Для цикла секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx подготавливают картридж и проточную ячейку, затем следуют указаниям программы для подготовки и запуска прогона (Рисунок 4). Формирование кластеров и секвенирование проводится прибором. После завершения прогона автоматически запускается промывка прибора уже загруженными в него реагентами.

Рисунок 4. Процесс секвенирования

Создать

Создайте прогон в программном модуле Local Run Manager. См. руководство по протоколу анализа для вашего конкретного модуля.



Подготовьте новый картридж с реагентами: разморозьте и осмотрите его. Подготовьте новую проточную ячейку: доведите ее до комнатной температуры, разверните и осмотрите.



Денатурирование и разведение библиотек. См. инструкцию в листовке-вкладыше по подготовке библиотеки.



Загрузите разведение библиотеки в резервуар №10 картриджа библиотеки.



На главном экране NOS прибора, выберите «**Sequence**» (секвенирование), ваш код прогона, и начните этапы настройки прогона. Выберите «**Run**» (прогон).



Загрузите проточную ячейку.



Извлеките и перезагрузите израсходованный контейнер с реагентами. Загрузите картридж с буфером и картридж с реагентами.



Просмотрите результаты проверки перед прогоном. Выберите «**Start**» (запуск). (Не требуется при настроенном автоматическом запуске).



Отслеживайте прогон в операционном программном обеспечении или на подключенном к сети компьютере с Local Run Manager.



Промывка прибора начинается автоматически после завершения секвенирования.

Подробные инструкции по использованию прибора и способы устранения неполадок приведены в Руководстве справочном для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS).

5. Техническое описание медицинского изделия

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx предназначен для секвенирования библиотек ДНК, подготовленных с использованием индексированных праймеров и последовательностей захвата для амплифицируемых мишеней. Библиотеки образцов захватываются в проточной ячейке, секвенирование проводится с использованием метода секвенирования путем синтеза (далее SBS, от sequencing by synthesis). В процессе SBS используются обратимые терминаторы для обнаружения флуоресцентно меченных нуклеотидных оснований при их встраивании в растущие цепи ДНК. Программное обеспечение прибора выполняет анализ изображений и распознает нуклеотиды, в каждом

цикле секвенирования присваивает каждому из них показатель качества. По завершении первичного анализа прибор проводит вторичный анализ для распознавания оснований. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx использует различные методы вторичного анализа в зависимости от протокола (т.е. герминативного или соматического). Для модулей распознавания герминальных и соматических вариантов обработка данных включает в себя демультиплексирование, генерацию файла FASTQ, выравнивание, распознавание вариантов и создание файлов распознавания вариантов (VCF), содержащих информацию об обнаруженных в специфических позициях референтного генома вариантах. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx является медицинским изделием для диагностики in vitro (IVD), подконтрольным FDA и подлежащим маркировке CE. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx может применяться клиническими лабораториями для разработки и проведения широкого спектра аналитических процедур, от секвенирования следующего поколения (NGS) для IVD с использованием целевых панелей до клинических исследований, так и геномов целиком.

Фотография, общий вид медицинского изделия (передняя сторона)



Фотография, общий вид медицинского изделия



Основная комплектация и перечень компонентов медицинского изделия

Базовая комплектация:

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS), в составе:

1. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)



Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS) предназначен для секвенирования библиотек ДНК при использовании наборов реагентов для диагностики in vitro. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx используется с наборами реагентов: "Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот" и "Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот" при использовании с медицинскими изделиями, такими как: "Набор для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения", "Система неинвазивного пренатального тестирования для определения множественных врожденных анеуплоидий ИВД VeriSeq™ NIPT Solution v2, анализ нуклеиновых кислот, в вариантах исполнения" и аналитическим программным обеспечением.

Количество – 1 шт.

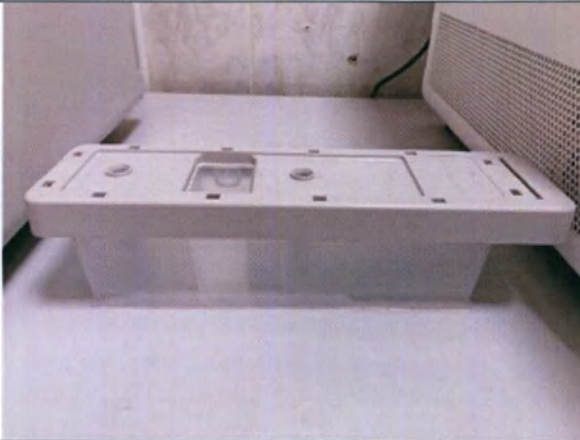
Высота: 58,5 см ± 10 %

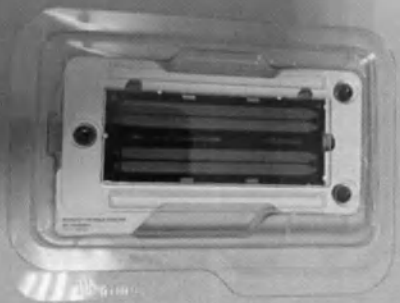
Ширина: 54,0 см ± 10 %

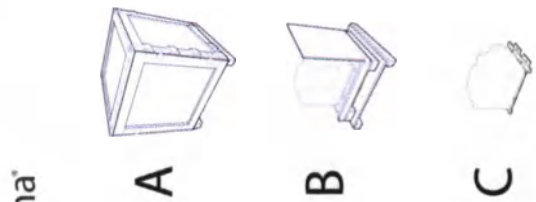
Глубина: 69,0 см ± 10 %

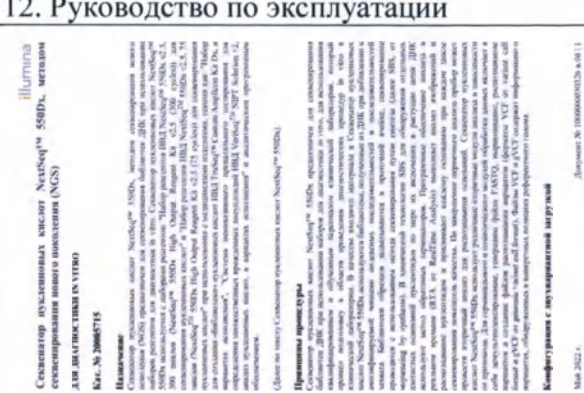
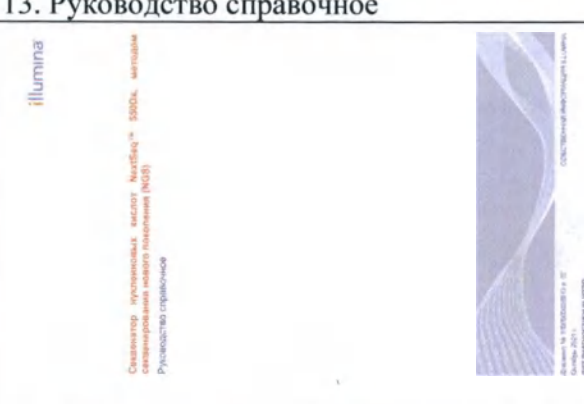
Масса: 84,0 кг ± 10 %

2. Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)

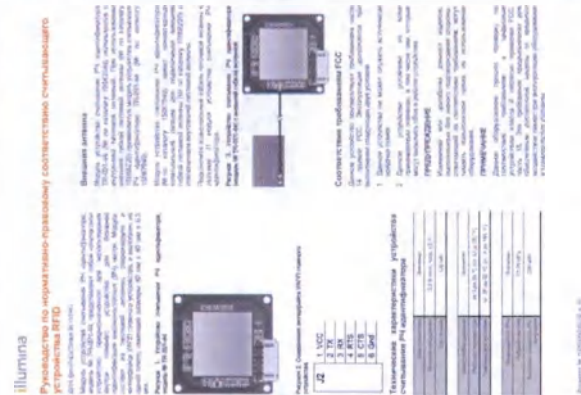
	Лоток для промывочного буфера - расходный материал для однократного использования, имеет три резервуара, уже заполненных буферными и промывочными растворами. <i>Количество – 1 шт.</i> <i>Длина: 36,8 см ± 10 %</i> <i>Высота: 9,6 см ± 10 %</i> <i>Ширина: 9,9 ± 10 %</i> <i>Масса: 432,0 г ± 10 %</i>
3. Резервуар для отходов (Waste bottle)	Резервуар для отработанных реагентов. Флакон, в который собираются использованные реагенты. <i>Количество – 1 шт.</i> <i>Длина: 40,5 см ± 10 %</i> <i>Высота: 8,7 см ± 10 %</i> <i>Ширина: 9,5 см ± 10 %</i> <i>Масса: 527,0 г ± 10 %</i>
4. Лоток для промывки (Reagent Wash Tray)	Лоток, содержащий промывочный раствор. Лоток для промывки вручную после прогона или для быстрой промывки. <i>Количество – 1 шт.</i> <i>Длина: 27,4 см ± 10 %</i> <i>Высота: 5,1 см ± 10 %</i> <i>Ширина: 21,2 см ± 10 %</i> <i>Масса: 416,0 г ± 10 %</i>
5. Адаптер для сканирования биочипов (Beadchip Adapter)	

	Адаптер фиксирует биочип и позволяет ему занять правильное положение перед сканированием. <i>Количество – 1 шт.</i> <i>Длина: 14,0 см ± 10 %</i> <i>Высота: 0,9 см ± 10 %</i> <i>Ширина: 8,0 см ± 10 %</i> <i>Масса: 76,0 г ± 10 %</i>
6. Ячейка проточная, тестовая (Wash flow cell)	
	Проточная ячейка со стеклянной подложкой. Для очистки проточной ячейки и общей проверки проточной системы. <i>Количество – 1 шт.</i> <i>Длина: 17,0 см ± 10 %</i> <i>Высота: 1,8 см ± 10 %</i> <i>Ширина: 12,8 см ± 10 %</i> <i>Масса: 280,0 г ± 10 %</i>
7. Кабель локальной сети (Ethernet Cable)	
	Экранированный кабель для локальной сети CAT-5E. <i>Количество – 1 шт.</i> <i>Длина: 3,0 метра ± 10 %</i> <i>Диаметр: 0,6 см ± 10 %</i>
8. Комплект беспроводной клавиатуры и мыши (Wireless keyboard with non-integrated mouse)	

	Беспроводная клавиатура и мышь, устройства для ввода информации. <i>Количество – 1 шт.</i> Клавиатура Длина: 48,6 см ± 10 % Высота: 4,57 см ± 10 % Ширина: 22,7 см ± 10 % Масса: 601,0 г ± 10 % (включая алкалиновые батареи 2 АА, масса батареек может различаться). Мышь Длина: 11,3 см ± 10 % Высота: 3,96 см ± 10 % Ширина: 5,83 см ± 10 % Масса: 65,9 г ± 10 % (включая алкалиновые батареи 2 АА, масса батареек может различаться).
9. Кабель питания (Power Cord)	
	Кабель питания, подходящий для местных условий. Используется для подключения устройства к сети электропитания. <i>Количество – 1 шт.</i> Длина: 2,5 метра ± 10 % Диаметр: 0,7 см ± 10 % Максимально допустимая нагрузка: 220–240 VAC 10 A
10. Руководство по распаковке	
 illumina® 19832712 A	В руководстве изложены инструкции по распаковке прибора. Бумага белого цвета. <i>Количество – 1 шт.</i>
11. Листовка информационная	

	Этот документ содержит важную информацию для потребителя — упрощенную декларацию соответствия. Бумага белого цвета. Количество – 1 шт.
12. Руководство по эксплуатации 	Инструкции для пользователя. Бумага белого цвета. Количество – 1 шт.
13. Руководство справочное 	В этом руководстве представлены описание системы и инструкции по работе и техническому обслуживанию. Бумага белого цвета. Количество – 1 шт.
14. Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager, модуль анализа герминальных вариантов	

18. Руководство по нормативно-правовому соответствию считывающего устройства RFID



В руководстве описаны меры предосторожности, маркировка соответствия и нормативные требования для считывающего устройства RFID (модель № TR-001-44), которое является внутренним компонентом прибора.

Бумага белого цвета.

Количество – 1 шт.

19. Листок – вкладыш с расшифровкой символов



В документе приведена общая расшифровка условных обозначений, которые могут встречаться на маркировке этой продукции.

Бумага белого цвета.

Количество – 1 шт.

20. Листок – вкладыш для клиента



Этот документ содержит важную информацию для потребителя — упрощенную декларацию соответствия.

Бумага белого цвета.

Количество – 1 шт.

21. Фильтр воздушный (Air filter)



Фильтр, очищающий воздух, который используется для охлаждения прибора. Воздушный фильтр находится в специальном отделении на задней стороне прибора.

Количество: не более 100 шт. (при необходимости)

Длина: 23,5 см $\pm$ 10 %

Высота: 2,0 см $\pm$ 10 %

Ширина: 29,0 см $\pm$ 10 %

Масса: 248,0 г $\pm$ 10 %

22. Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon (TruSeq™ Custom Amplicon Filter Plate)



Включает один сменный фильтровальный планшет для проведения анализа с использованием Набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx.

Количество: не более 100 шт. (при необходимости)

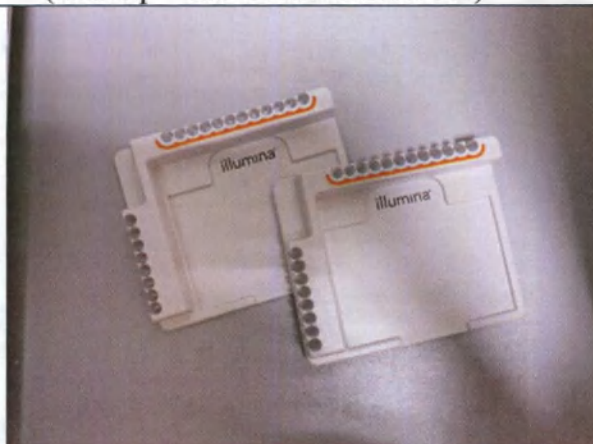
Длина: 12,8 см $\pm$ 10 %

Высота: 1,6 см $\pm$ 10 %

Ширина: 8,6 см $\pm$ 10 %

Масса: 73,0 г $\pm$ 10 %

23. Набор адаптеров для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture Kit)



Для правильного расположения индексных праймеров перед ПЦР-амплификацией.

Количество: 2 шт./набор – не более 100 шт. (при необходимости)

Длина: 16,8 см $\pm$ 10 %

Высота: 2,5 см $\pm$ 10 %

Ширина: 13,9 см $\pm$ 10 %

Масса: 87,0 г $\pm$ 10 % (одна шт.)

24. Комплект функциональных штативов для плашки и адаптеров для центрифугирования TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture & Collar Kit), в составе:

1. Адаптер для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture) – 2 шт.

2. Рамка-переходник для центрифугирования фильтр-планшета (Adapter Collar for Centrifugation) – 2шт.	
 The image shows a white plastic adapter collar with a serrated edge and a small square frame next to it. The brand name 'illumina' is visible on the collar.	Для правильного расположения индексированных праймеров перед ПЦР-амплификацией. Количество: не более 100 шт. (при необходимости) Адаптер для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture) Длина: 16,8 см ± 10 % Высота: 2,5 см ± 10 % Ширина: 13,9 см ± 10 % Масса: 87,0 г ± 10 % Рамка-переходник для центрифугирования фильтр-планшета (Adapter Collar for Centrifugation) Длина: 12,5 см ± 10 % Высота: 0,6 см ± 10 % Ширина: 8,2 см ± 10 % Масса: 12,0 г ± 10 %
25. Крышки запасные для индексных адаптеров (Index Adapter Replacement Caps)	
 The image shows two bags of replacement caps. The top bag contains orange caps and the bottom bag contains white caps. Both bags have labels with 'illumina' branding and technical specifications.	Крышки для индексных пробирок (цвет: оранжевый) для преамплификации — 48 крышек в упаковке. Крышки для индексных пробирок (цвет: белый) для преамплификации — 32 крышки в упаковке. Количество: 2 шт./уп. – не более 100 шт. (при необходимости) Длина: 1,5 см ± 10 % Высота: 0,9 см ± 10 % Ширина: 0,8 см ± 10 % Масса: 20,0 г ± 10 %

5.1. Составные части прибора

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx включает в себя монитор с сенсорным экраном и модули: отделение визуализации, строку состояния, отделение для буфера, отделение для реагентов, отделение для воздушного фильтра и кнопку включения питания, как показано на рисунке 5 ниже.

Рисунок 5. Основные компоненты прибора



5.2 Отделение визуализации

В отделении визуализации размещен держатель, который включает в себя три направляющих штыря для расположения проточной ячейки. После загрузки проточной ячейки дверца отделения визуализации закрывается автоматически, и компоненты перемещаются в надлежащее положение.

5.3 Отделения для реагентов и буфера

Для постановки прогона секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx необходим доступ к отделению для реагентов и буфера для загрузки расходных материалов и опорожнения резервуара для использованных реагентов.

5.4 Отделение для фильтра воздушного

Отделение для фильтра воздушного удерживает фильтр воздушный и расположено с задней стороны прибора. Фильтр воздушный заменяют раз в 90 дней. Информацию о замене фильтра см. в разделе «Замена фильтра воздушного» справочного руководства для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS).

5.5 Кнопка включения в сеть

Кнопка включения в сеть на передней стороне секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx включает электропитание прибора и приборного компьютера. В зависимости от состояния электропитания прибора кнопка включения в сеть выполняет описанные ниже действия. По умолчанию секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx запускается в диагностическом режиме.

5.6 Отделение для реагентов

В отделении для реагентов находятся картриджи с реагентами и буферными растворами, отделение закрывается дверцей, как показано на рисунке 6 ниже.

Рисунок 6. Отделение для реагентов



5.7 Описание проточной ячейки

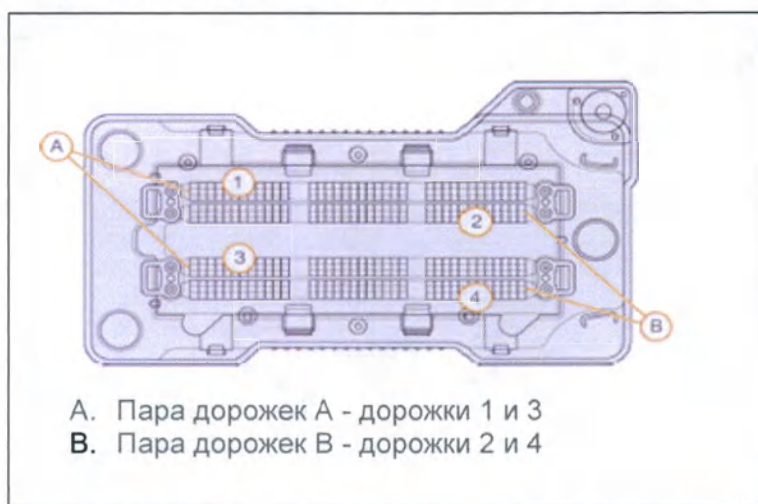
Проточная ячейка — подложка на основе стекла, на которой происходит генерация кластеров и выполняется реакция секвенирования. Проточная ячейка заключена в специальный картридж. Проточная ячейка содержит 4 дорожки, которые визуализируются попарно, следующим образом:

- Дорожки 1 и 3, называемые парой дорожек А, визуализируются одновременно;
- Дорожки 2 и 4, называемые парой дорожек В, визуализируются после завершения визуализации пары дорожек А.

Хотя проточная ячейка содержит 4 дорожки, на одной проточной ячейке можно выполнить секвенирование только одной библиотеки или группы объединенных библиотек. Библиотеки загружают на картридж с реагентами из одного резервуара, и их перенос на все

4 дорожки проточной ячейки осуществляется автоматически. Визуализация каждой дорожки осуществляется в виде изображений небольшой площади, называемых блоками. Блок — область визуализации на проточной ячейке, соответствующая полю зрения камеры. Общее количество блоков зависит от количества дорожек, полос и поверхностей, визуализируемых на проточной ячейке, и того, как взаимодействуют между собой камеры, получающие изображения. Проточные ячейки с высоким выходом содержат 864 блока. **На рисунке 7** изображена проточная ячейка

Рисунок 7. Изображение проточной ячейки



Общие сведения о картридже с реагентами

Картридж с реагентами представляет собой реагенты однократного применения с RFID-прослеживанием и запаянными фольгой резервуарами, предварительно наполненными реагентами для кластеризации и секвенирования. Картридж с реагентами включает в себя специальный резервуар для загрузки подготовленных библиотек. Как только начинается прогон, перенос библиотек из резервуара в проточную ячейку осуществляется автоматически.

Несколько запасных резервуаров оставлено для автоматической промывки после каждого прогона. Промывочный раствор перекачивается через всю систему из картриджа с буфером в запасные резервуары, а затем в контейнер для использованных реагентов. **На рисунке 8** изображен картридж с реагентами.

Рисунок 8. Изображение картриджа с реагентами



6. Совместное использование с другими медицинскими изделиями или материалами.

Расходные материалы и наборы реагентов, необходимые для секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, поставляются отдельно. Каждый набор реагентов включает в себя одну проточную ячейку, картридж с реагентами, картридж с буфером и буфер для разбавления библиотеки. Дополнительную информацию можно найти в Инструкции по применению на набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот и в Инструкции по применению на Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот. Для идентификации проточной ячейки, картриджа с реагентами и картриджа с буфером используется радиочастотная идентификация (RFID), позволяющая точно отслеживать расходные материалы и обеспечивающая их совместимость.

Хранение наборов реагентов и расходных материалов

Условия хранения наборов реагентов для секвенирования и расходных материалов представлены в таблицах ниже.

Наборы реагентов для секвенирования

Компонент (1 на цикл секвенирования)	Условия хранения
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) (NextSeq™ 550Dx Accessory Box (300 cycles))	от -25°C до -15°C
Картридж с реагентами NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles))	от -25°C до -15°C
Картридж с буфером NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles))	от 15°C до 30°C
Картридж с проточной ячейкой NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles))*	от 2°C до 8°C
Картридж с реагентами NextSeq™ 550Dx v2, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (75 cycles))	от -25°C до -15°C
Картридж с буфером NextSeq™ 550Dx v2, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx Buffer Cartridge v2 (75 cycles))	от 15°C до 30°C
Картридж с проточной ячейкой NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (75 cycles))	от 2°C до 8°C

Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) (NextSeq™ 550Dx Accessory Box (75 cycles))	от -25°C до -15°C
Компонент (1 на цикл секвенирования)	Условия хранения
Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот, в составе:	
Картридж с реагентами NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles))	от -25°C до -15°C
Картридж с буфером NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles))	от 15°C до 30°C
Картридж с проточной ячейкой NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles))*	от 2°C до 8°C
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) (NextSeq™ 550Dx Accessory Box (300 cycles))	от -25°C до -15°C
Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот, в составе:	
Картридж с реагентами NextSeq™ 550Dx v2, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (75 cycles))	от -25°C до -15°C
Картридж с буфером NextSeq™ 550Dx v2, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx Buffer Cartridge v2 (75 cycles))	от 15°C до 30°C
Картридж с проточной ячейкой NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (75 cycles))*	от 2°C до 8°C
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) (NextSeq™ 550Dx Accessory Box (75 cycles))	от -25°C до -15°C

* Перевозку картриджа с проточной ячейкой NextSeq™ 550Dx v2.5 (NextSeq™ 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5) осуществляют при комнатной температуре.

Расходные материалы, обеспечиваемые пользователем

Смоченные спиртом салфетки, 70 % изопропиловый спирт или Этанол, 70 %	VWR, Кат. №95041-714 (или эквивалент) Основной поставщик лаборатории	Для очистки проточной ячейки и универсального использования
Лабораторные безворсовые салфетки	VWR, Кат. №21905-026 (или эквивалент)	Для очистки проточной ячейки и универсального использования

Расходные материалы для технического обслуживания, обеспечиваемые пользователем

NaOCl, 5 % (гипохлорит натрия)	Sigma-Aldrich, кат. № 239305 (или эквивалент лабораторной чистоты) степени	Для промывок вручную после прогона; концентрация раствора 0,12 %
Твин-20	Sigma-Aldrich, кат. № P7949	Для промывок вручную; концентрация раствора 0,05 %

Вода, лабораторной степени чистоты	Основной поставщик лаборатории	Промывка прибора (вручную)
Фильтр воздушный	Illumina, кат. № 20022240	Очищает воздух, который используется для охлаждения прибора.

7. Маркировка

На маркировке секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx указан серийный номер, как показано на **рисунке 9**: серийный номер секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, и знаки соответствия стандартам, как показано на **рисунке 10** ниже.

Рисунок 9. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx — серийный номер

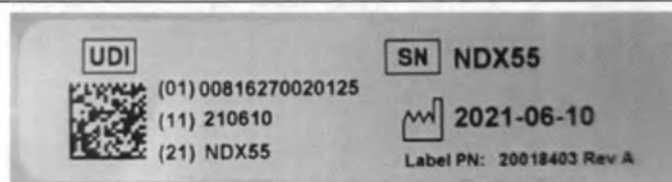


Рисунок 10. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, маркировка соответствия стандартам

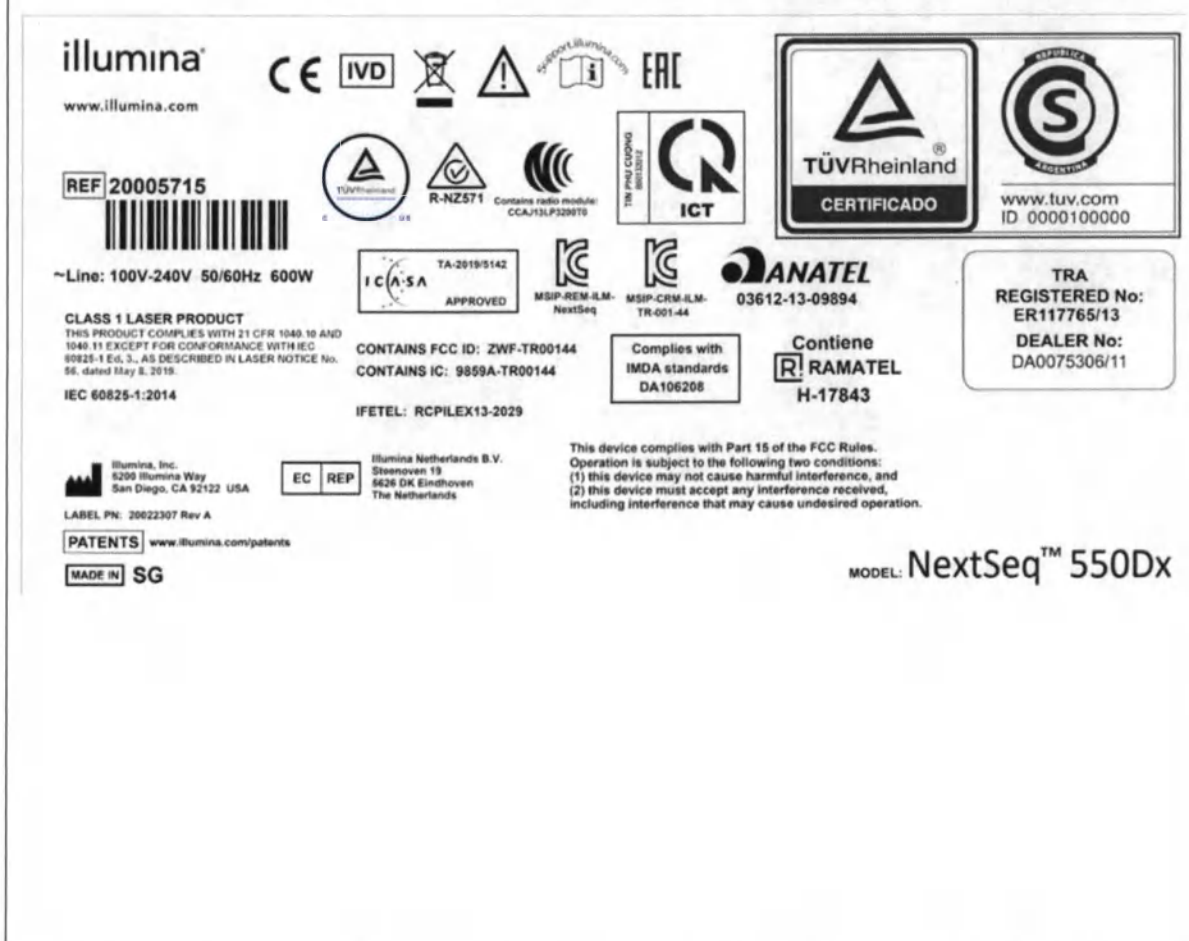
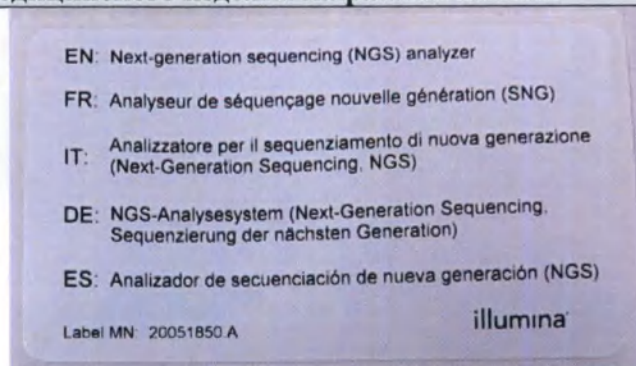


Рисунок 11. Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, маркировка с наименованием медицинского изделия на разных языках



Пример дополнительной маркировки на русском языке:

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS).

Кат. № 20005715

Регистрационное удостоверение

№ РЗН 2021/13216 от 20 января 2021 года

Номер серии, дата производства, графические символы указаны на оригинальном стикере и упаковке.

Только для диагностики ин витро.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

ПРОИЗВЕДЕНО В СИНГАПУРЕ

** Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя*

Маркировка компонентов медицинского изделия

Компоненты:

Маркировка, Кабель питания (Power Cord)



Маркировка, Адаптер для сканирования биочипов (Beadchip Adapter)



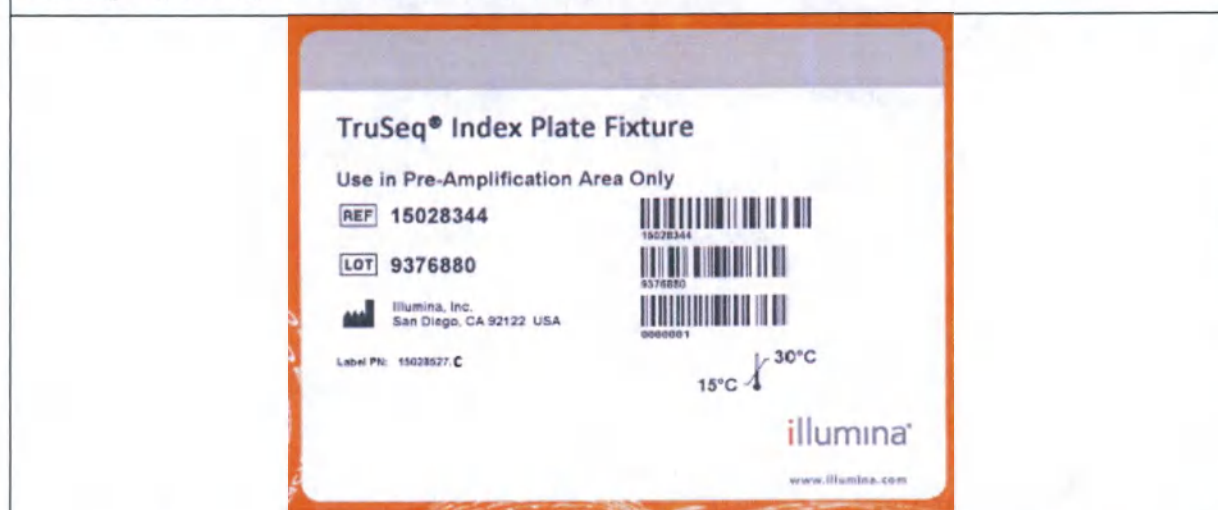
Маркировка, Ячейка проточная, тестовая (Wash flow cell)



Маркировка, Фильтр воздушный (Air filter)



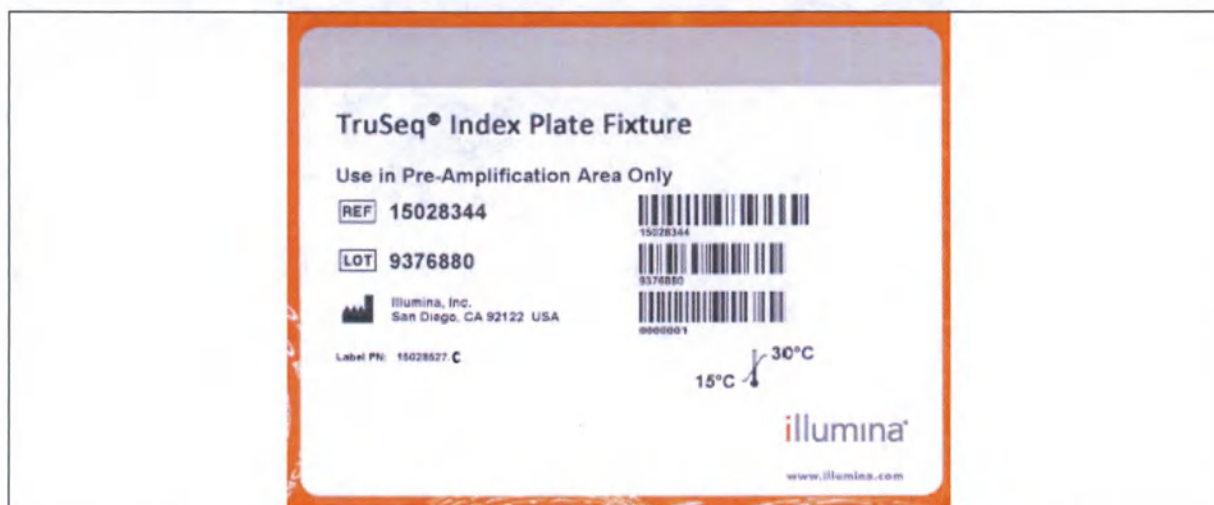
Маркировка, Набор адаптеров для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture Kit)



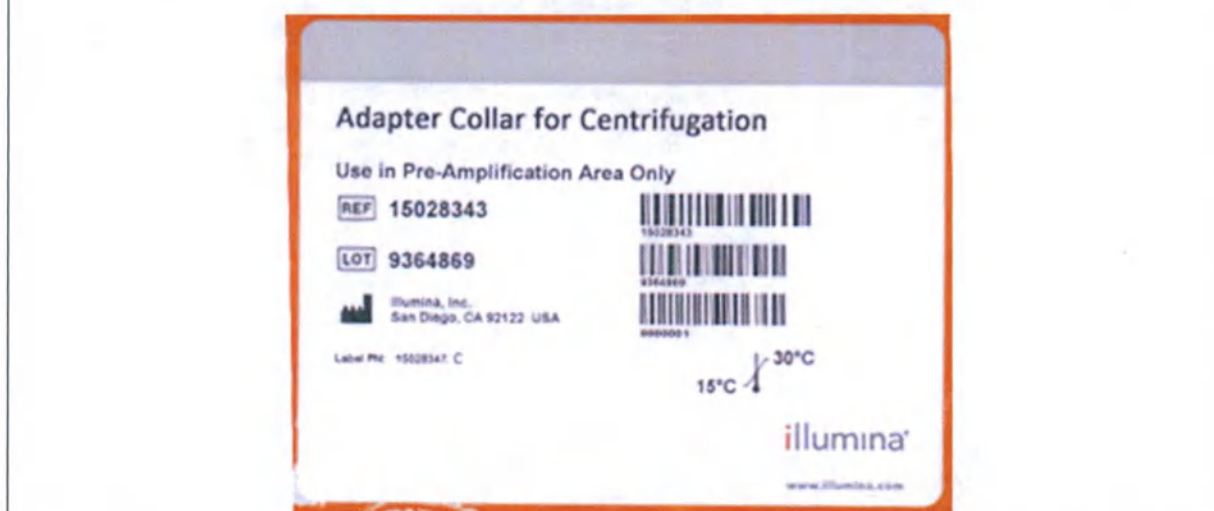
Маркировка, Комплект функциональных штативов для плашки и адаптеров для центрифугирования TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture & Collar Kit), в составе:

1. Адаптер для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture) – 2 шт.
2. Рамка-переходник для центрифугирования фильтр-планшета (Adapter Collar for Centrifugation) – 2шт.

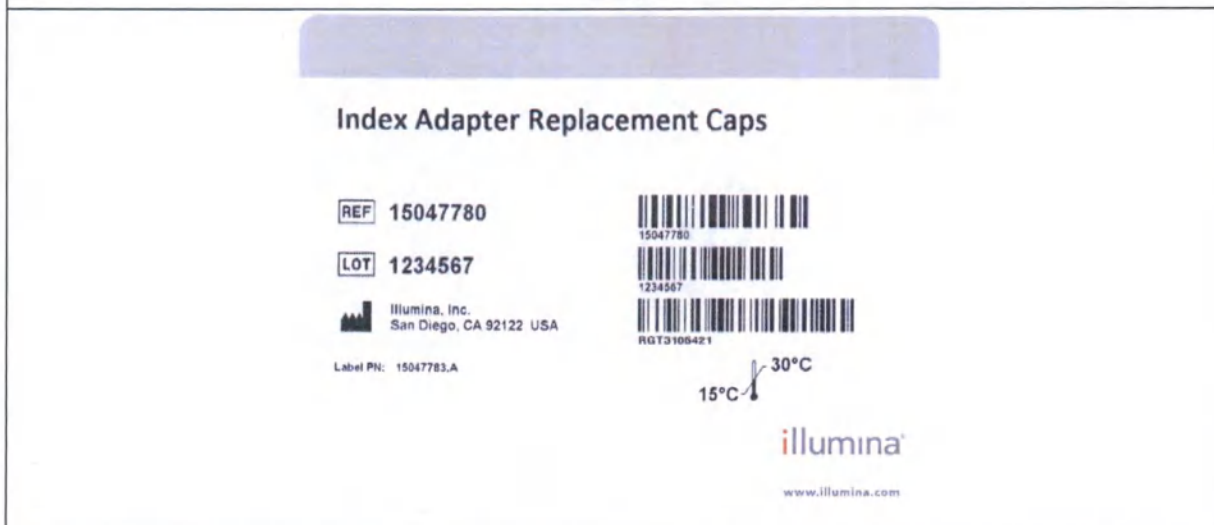
Адаптер для 96-луночных планшетов и индексных пробирок TruSeq™ (TruSeq™ Index Plate Fixture)



Рамка-переходник для центрифугирования фильтр-планшета (Adapter Collar for Centrifugation)



Маркировка, Крышки запасные для индексных адаптеров (Index Adapter Replacement Caps)



8. Информация об упаковке

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx полностью помещен в пакет из антистатического полиэтилена, как показано на рисунке 12: прибор, упакованный в полиэтиленовую пленку. Этикетка наклеена на верхнюю часть пакета.

Рисунок 12. Прибор, упакованный в полиэтиленовую пленку



Этот прибор поставляется со следующими компонентами:

Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) (PN 15049178/20021814), Резервуар для отходов (Waste bottle) (PN 15049517), Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) (PN 15049524/20021817), Адаптер для сканирования биочипов (Beadchip Adapter) (PN 15069951), Ячейка проточная, тестовая (Wash flow cell) (PN 15050205), Кабель локальной сети (Ethernet Cable) (PN 20021730), Комплект беспроводной клавиатуры и мыши (Wireless keyboard with non-integrated mouse) (PN 20018455), Кабель питания (Power Cord) (PN 0419-0022), и другие. Полный список компонентов к прибору см. в Разделе 1.2., обернутые слоем вспененного антистатического полиэтилена для защиты от повреждений, как показано на рисунке 13: Упаковка прибора и компонентов

Рисунок 13. Упаковка прибора и компонентов



Прибор установлен вертикально, запечатан и защищен, как показано на рисунке 14: Упаковка прибора. Этикетки с маркировкой PN: 20004116 и 20022482 наклеены на верхней и передней панели упаковочного ящика. Крупным планом этикетки показаны справа от рисунка 14.

Рисунок 14. Упаковка прибора



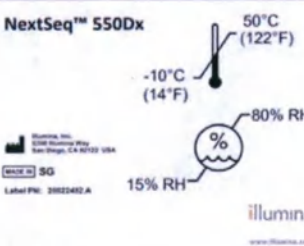
Этикетка с маркировкой PN 2004116

LBL, 3X3_INSTR_MFG_SN_General

1. Diagram



Этикетка с маркировкой PN 20022482

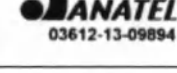


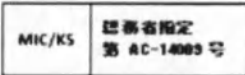
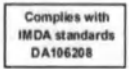
Высота x ширина x глубина:
97 см x 90 см x 94 см

Масса в упаковке: 165 кг

Значение символов

Символ	Определение
	Обратитесь к инструкции по применению
	Производитель
	Дата производства
	Температурный диапазон
	Использовать до/дата истечения срока годности
IVD	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
REF	Номер по каталогу — указан номер по каталогу производителя, позволяющий идентифицировать устройство
SN	Серийный номер
LOT	Номер партии
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Предупреждения о рисках при работе с лазером
	Предупреждения о рисках поражения электрическим током
	Предупреждения о рисках при нагревании прибора
	Предупреждения о рисках при обращении с тяжелыми объектами
	Предупреждения о рисках механических повреждений
	Выкл
	Вкл
	Заземление
	WEEE (Waste Electrical and Electronic Equipment — утилизация электрического и электронного оборудования)
	Соответствие требованиям ЕС
EAC	Символ EAC Соответствие требованиям EAC
Illumina®	Логотип компании
	Штрих-код
	Допустимая влажность
	Знак ANATEL и номер регистрации (Бразилия)
	Логотип КС + регистрационный номер (Республика Корея)
	Знак NCC и регистрационный номер Тайвань
	Соответствие нормативным требованиям (RCM) (Требования к радиосвязи Австралии/Новой Зеландии (ANZ))

	Знак безопасности NRTL (США, Канада)
	Знак соответствия требованиям к радиочастотам, установленным министерством внутренних дел и коммуникаций (MIC) Японии
	Знак сертификации организацией «ТЮФ» (TÜV)
	Знак регистрации изделия Службой по контролю в сфере телекоммуникаций Саудовской Аравии
	Знак сертификации Национальной организацией связи Аргентины (ENACOM)
	Знак сертификации Службой развития информационно-коммуникационных средств Сингапура (IMDA)
	Знак сертификации, подтверждающий соответствие электрического или электронного оборудования требованиям безопасности Республики Корея
	Знак соответствия требованиям в области информационно-коммуникационных технологий Вьетнама
	Знак сертификации Независимой службой коммуникации Южной Африки
	Произведено в Сингапуре
	ПАТЕНТЫ
	Идентификатор уникального прибора (Unique Device Identification)

	Верх
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Беречь от влаги

9. Условия транспортировки, хранения и эксплуатации

Условия транспортировки:

Элемент	Требования
Температура	от -10 °С до 50 °С (от 14 °F до 122 °F).
Влажность	Относительная влажность без образования конденсата 15-80 %.

Условия хранения и эксплуатации:

Элемент	Требования
Температура	<i>Хранение:</i> от -10 °С до 50 °С (от 14 °F до 122 °F). <i>Эксплуатация:</i> Поддерживайте температуру в лаборатории от 19 до 25 °С (22 ± 3 °С). Это соответствует рабочей температуре прибора. Во время прогона не допускайте изменения окружающей температуры более чем на ±2 °С.
Влажность	<i>Хранение:</i> Относительная влажность без образования конденсата 15-80 %. <i>Эксплуатация:</i> Поддерживайте уровень относительной влажности без образования конденсата в пределах 20–80 %.
Высота над уровнем моря	Устанавливайте прибор на высотной отметке ниже 2000 метров (6500 футов).
Качество воздуха	Используйте прибор в условиях воздуха степени загрязнения II или чище. Воздух степени загрязнения II обычно содержит только непроводящие загрязняющие вещества.
Вентиляция	Проконсультируйтесь с соответствующим отделом вашей компании, чтобы выработать требования к вентиляции на основании характеристик тепловыделения прибора.
Вибрация	Ограничьте постоянную вибрацию пола лаборатории до уровня офиса ISO. Во время проведения секвенирования не превышайте пределы операционной комнаты ISO. Избегайте периодических ударов или возмущений вблизи прибора.

10. Основные параметры, характеристики (функциональные, технические), ограничение процедуры/ метрики качества прогона медицинского изделия

Функциональные характеристики

Предел обнаружения	0,05
--------------------	------

Ограничение процедуры/ Метрики качества прогона*

Объем получаемой информации после секвенирования	≥ 90 гигабайт (Gb).
Длина прочтения (парноконцевого прогона)	2 x 150 пар оснований (п.о.).
Оснований с показателем качества минимум $Q30 \geq 75\%$ при длине прочтения 2 x 150 п. о.	75 % оснований или более с показателем качества $Phred \geq 30$, что означает точность распознавания оснований выше 99,9 %.
Программное обеспечение метода не выравнивает прочтения с инделами (инсерциями, делециями или их комбинациями) при их длине > 25 п. о. / Контролируемый параметр - максимальная длина индела (инсерции, делеции или их комбинации) для выровненного прочтения	≤ 25 п. о.
Программное обеспечение метода не выявляет инделы длиной > 25 п.о. / Контролируемый параметр - максимальная длина выявленного-индела	≤ 25 п. о.
<i>Программное обеспечение метода может не выравнивать прочтения для ампликонов со сложным составом, в результате чего область будет расценена как дикий тип. Под сложным составом подразумевают:</i>	
Прочтения, содержащие более трех инделов / Контролируемый параметр - максимально допустимое число инделов в выровненной последовательности	не более трех инделов
Прочтения длиной как минимум 30 п.о. с содержанием однонуклеотидного варианта $SNV > 4\%$ от общей целевой длины ампликона (исключая области зонда) и Прочтения длиной < 30 п.о. с содержанием $SNV > 10\%$ от общей длины ампликона (включая области зонда) /Контролируемые параметры - максимальное содержание SNV в выровненной последовательности, в % от общей длины ампликона	Для ампликонов длиной ≥ 30 п.о., содержание $SNV \leq 4\%$ Для ампликонов длиной < 30 п.о., содержание $SNV \leq 10\%$

Ограничения, специфичные для герминальных вариантов	
Минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного определения варианта <i>(Необходимое количество фрагментов ДНК)</i>	150x <i>(Соответственно, требуется 150 фрагментов, что эквивалентно 300 перекрывающимся парным прочтениям)</i>
Фильтр повторов RMxN (Не менее 9 повторов). Учитываются только повторы длиной до 5 п.о (R5x9)./Контролируемое условие - максимальное число повторов длиной до 5 п. о. в выровненной последовательности	8
Ограничения, специфичные для соматических вариантов	
Минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного распознавания варианта <i>(Необходимое количество фрагментов ДНК на пул олигонуклеотидов)</i>	450x на один набор олигонуклеотидов <i>(Соответственно, требуется 450 фрагментов ДНК на набор олигонуклеотидов, что эквивалентно 900 перекрывающимся парным прочтениям)</i>
Количество повторов, необходимых для распознавания соматического варианта, (как минимум 6 повторов в референтном геноме). Учитываются только повторы длиной до 3 п.о. (R3x6) /Контролируемое условие - максимальное число повторов длиной до 3 п. о. в выровненной последовательности	5
Частота варианта	$\geq 0,026$

* **Метрика качества прогона** – это контрольные условия, по которым принимается решение о валидности или не валидности результатов анализа. Контрольные условия должны быть соблюдены.

Технические характеристики

Управляющий компьютер	
Процессор:	Dual Intel® Xeon® E5-2648L v3 1,8 ГГц ЦПУ
Память:	128 Гб
Жесткий диск, диагностический (Dx) модуль	2 × 2 TB (RAID 1)
Жесткий диск, исследовательский модуль	2 × 2 TB (RAID 1)
Операционная система:	Windows 10
Монитор	Сенсорный
Требования к месту на диске	
Емкость запоминающего устройства	приблизительно 1,5 ТБ

компьютера, объединенного с прибором	
Светоизлучающие диоды (LED)	
Светоизлучающие диоды (LED)	521 нм, 650 нм
Диодный лазер:	780 нм,
Класс лазера	1
Максимальная выходная мощность лазера	12 мВт
Требования к электропитанию	
Напряжение в сети	100-240 В 50/60 Гц
Класс энергоэффективности	600 Ватт, максимум
Рекомендация по источнику бесперебойного питания (не поставляется вместе с прибором)	
APC Smart UPS 2200 VA LCD 230 V (международные)	
Максимальная мощность	1980 Вт
Входное напряжение	220-240 VAC
Номинальное значение	
Частота входного напряжения	50/60 Гц
Входное соединение	IEC-320 C20
Стандартное время прогона (300 Вт)	90 минут
Стандартное время прогона (600 Вт)	40 минут
Размеры	
Размеры и содержимое упаковки	
Высота x ширина x глубина:	97 см x 90 см x 94 см
Масса в упаковке:	165 кг
Размеры прибора	
Высота x масса x диаметр:	58 см x 54 см x 69 см
Масса:	84 кг
Спецификации ридера RFID	
Спецификация электропитания	
Входное напряжение	3,3 Вольт DC $\pm$ 5 %
Ток питания	120 мА
Электротехнические требования	
Температура эксплуатации	19-25 C (22 ± 3 C)
Температура хранения	-10 C -50
Спецификация радиочастот	
Рабочая частота	13,56 МГц
Выходная РЧ мощность	200 мВт

Рабочие характеристики

Данные из Руководства по эксплуатации на Секвенатор NextSeq™ 550Dx

Рабочие характеристики секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx установлены для модулей для герминальных и соматических вариантов с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот и подтверждены с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) для секвенирования нуклеиновых кислот. Исследовали индексирование образцов, перенос анализируемого материала из одного образца в другой при проведении анализа, количество вносимой ДНК, аналитическую чувствительность (предел холостого образца/предел обнаружения), точность, прецизионность, сравнение методов и воспроизводимость.

Аналитические исследования с использованием набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)) были разработаны для оценки заявленных рабочих характеристик, ранее установленных при использовании ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). Результаты показывают, что рабочие характеристики наборов реагентов (v2 и v2.5) сопоставимы с набором реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения. Рабочие характеристики, связанные с преаналитическими факторами, такими как методы выделения ДНК и присутствие посторонних веществ см. в инструкции по применению набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения.

Определения, используемые при расчетах рабочих характеристик:

- 1 Процент согласованности положительных результатов (positive percent agreement - PPA) рассчитывается как доля локусов, классифицированных референтным методом как варианты, правильно выявленных при анализе.
 - ▶ (число вариантных локусов, правильно выявленных при анализе)/(общее число вариантных локусов)
Вариантные локусы, выявленные при анализе и соответствующие выявленным референтным методом, являются истинно положительными (TP). Вариантные локусы, выявленные при анализе как референтные или как другие варианты, являются ложноотрицательными (FN).
- 2 Процент согласованности отрицательных результатов (negative percent agreement - NPA) рассчитывается как доля локусов, классифицированных референтным методом как локусы дикого типа, правильно выявленных при анализе.
 - ▶ (число локусов дикого типа, правильно выявленных при анализе)/(общее число локусов дикого типа)
Локусы дикого типа, выявленные при анализе и соответствующие выявленным референтным методом, являются истинно отрицательными (TN). Локусы дикого типа, квалифицированные при анализе как варианты, являются ложноположительными (FP).
- 3 Процент общей согласованности (overall percent agreement - OPA) рассчитывается как доля локусов, правильно выявленных при анализе относительно референтного метода.

- ▶ $((\text{число вариантных локусов, правильно выявленных при анализе}) + (\text{число локусов дикого типа, правильно выявленных при анализе})) / ((\text{общее число вариантных локусов}) + (\text{общее число локусов дикого типа}))$
- 4 Расчеты PPA, NPA и OPA не включают в себя нераспознанные основания (вариантные или референтные локусы, не соответствующие одному или нескольким фильтрам качества).
- 5 Уровень распознавания аутосомных вариантов рассчитывается как общее число локусов, пропущенных фильтром, деленное на общее число позиций, секвенированных для хромосом 1-22; хромосомы X и Y исключены. Этот показатель не учитывает согласованности распознавания с референтным методом.

Индексирование образцов

Индексированные праймеры образца, внесенные во время приготовления библиотек, придают каждому образцу ДНК уникальную последовательность. Эти уникальные последовательности позволяют объединять несколько образцов в одном прогоне секвенирования. Индексация образцов используется в протоколах и для герминальных, и для соматических вариантов. Целью данного исследования было установить минимальное (8) и максимальное (96) число образцов, которые могут быть обработаны за один прогон секвенирования на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Тестировали 8 уникальных образцов проекта Platinum Genome с использованием 12 различных комбинаций, индексированных праймеров на образец. Результаты образца из четырех прогонов секвенирования с использованием модуля для герминальных вариантов сравнивали с данными Platinum Genomes версии 2016-1.0.

В первой серии прогонов 96 библиотек образцов с уникальной индексацией тестировали репрезентативным методом, направленным на множество генов с охватом 12 588 оснований на цель во всех 23 хромосомах человека, чтобы проверить способность анализа проводить согласованное генотипирование данного образца при различных комбинациях, индексированных праймеров. Во второй серии прогонов 8 библиотек образцов с уникальной индексацией секвенировали в двух прогонах секвенирования для проверки минимального числа поддерживаемых индексов.

Для прогонов с 96 индексами PPA для SNV составляла от 98,7% до 100%, PPA для инсерций и делеций - 100%, а NPA - 100% для каждой из 96 комбинаций индексов. Для прогонов с 8 индексами PPA составляла 100% (SNV, вставки и делеции) и NPA - 100% для каждой из восьми комбинаций индексов.

Перенос анализируемого материала из одного образца в другой при анализе

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет секвенировать нескольких образцов и контролей в одном прогоне секвенирования. Для оценки степени переноса образца при одном прогоне (внутри прогона) и между прогонами секвенирования (прогон-прогон, между прогонами) было проведено исследование. В репрезентативном анализе тестировали два образца из проекта Platinum Genome, один, полученный от мужчины, и один - от женщины. Анализ был направлен на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах, включая обе половые хромосомы. Библиотеки секвенировали с помощью секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, используя модуль для герминальных вариантов. Перенос образцов от мужчины в образцы от женщины оценивали по наличию прочтений ампликона Y-хромосомы в образцах от женщины.

Перенос внутри прогона может возникать при генерировании кластера, распознавании оснований при считывании индекса и демультимплексировании образца. Для тестирования переноса образцов внутри прогона на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx провели одно секвенирование пула библиотек, состоящего из 46 повторностей образцов от мужчины и женщины и четырех контролей без матрицы. Перенос внутри прогона оценивали путем сравнения покрытия ампликона Y-хромосомы в повторностях образца от женщины со средним покрытием ампликона Y-хромосомы всех повторностей образца от мужчины в пуле. Медиана наблюдаемого переноса внутри прогона составила 0,084%.

Для тестирования переноса образца между прогонами приготовили два пула библиотек, которые последовательно секвенировали на одном секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Первый пул содержал 46 повторностей образца от женщины и два контроля без матрицы. Второй пул содержал 46 повторностей образца от мужчины и два контроля без матрицы. Для обоих пулов использовали один и тот же индексированный адаптер. Сначала проводили прогон секвенирования пула от женщины, затем - от мужчины, затем - снова от женщины. Перенос между прогонами оценивали путем сравнения покрытия ампликона Y-хромосомы в соответствующих повторностях второго прогона пула от женщины и прогона пула от мужчины. Медиана наблюдаемого переноса между прогонами составила 0,0076%.

Количество вносимой ДНК

Кровь (герминальные варианты)

Для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx был установлен диапазон уровня вносимой ДНК крови при приготовлении библиотек с помощью набора реагентов создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения при использовании протокола для герминальных вариантов. Диапазон оценивали в исследовании серийных разведений 13 образцов из проекта Platinum Genome при репрезентативном анализе, направленном на множество генов с охватом 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. Библиотеку секвенировали на двух секвенаторах нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием одной партии набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)).

Пять образцов тестировали в двух повторностях при пяти вариантах вносимой ДНК в диапазоне от 250 до 12 нг (250 нг, 100 нг, 50 нг, 25 нг и 12 нг). Восемь образцов тестировали в одной повторности при пяти вариантах вносимой ДНК. Для определения точности генотипы образцов сравнивали с данными в Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Результаты определяли для каждого варианта вносимой ДНК. PPA для каждого типа вариантов (SNV, инсерции и делеции) приведены в таблице 1; NPA приведены в таблице 2. Точность при всех уровнях ДНК была одинаковой. Рекомендуемое количество ДНК для набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения составляет 50 нг, 25 нг и 100 нг - это соответственно нижний и верхний пределы внесения, обеспечивающие соответствие заявленным рабочим характеристикам.

Таблица 1. Результаты PPA для каждого варианта вносимой ДНК по типу вариантов

Вносимое количество ДНК (нг)	Тип варианта	Ожидаемые варианты	TP	FN	Нераспознанные варианты	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Инсерция	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Делеция	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Таблица 2. NPA для каждого варианта вносимой ДНК

Вносимое количество ДНК (нг)	TN	FP	Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Соматические варианты)

Для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx был установлен диапазон количества вносимой ДНК из фиксированных формалином, залитых в парафин образцов (FFPE) при приготовлении библиотек с помощью набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения при использовании протокола для соматических вариантов. Диапазон оценивали в исследовании серийных разведений трех образцов из проекта Platinum Genome при репрезентативном анализе, направленном на множество генов с охватом 12 588

оснований в 23 различных хромосомах. Культуры клеток проекта Platinum Genome GM12878 and GM12877 фиксировали формалином и заливали в парафин, после чего выделяли ДНК. Образец GM12878 разводили образцом GM12877 так, чтобы аллельные частоты вариантов (VAF) 81 варианта (55 SNV, 10 инсерций и 16 делеций) составляли около 0,025, 0,05 или 0,10. Кроме того, каждый образец содержал 91 вариант с более высокими частотами вариантов, до 1,0 VAF. Образцы обрабатывали в двух повторностях при пяти вариантах вносимого количества ДНК со средней разницей числа циклов (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 и 7,8, как измерено с помощью набора реагентов для оценки качества геномной ДНК, выделенной из образцов тканей, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки TruSeq™ Custom Amplicon Dx FFPE QC Kit. Каждую библиотеку секвенировали на двух секвенаторах нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием двух партий набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). Для определения точности, генотипы образцов сравнивали с Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Значения PPA для каждого варианта (SNV, инсерции и делеции) приведены в таблице 3, значения NPA приведены в таблице 4. Рекомендуемое количество вносимой ДНК для вариантов с 0,05 VAF или выше - dCq ≤ 4, значение 4,6 является нижним пределом для соответствия рабочим характеристикам.

Таблица 3. Результаты PPA для каждого количества вносимой ДНК по типу вариантов

Среднее значение dCq	Тип варианта	Ожидаемые варианты	Ожидаемое значение нераспознанных вариантов	Целевое разведение VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Нераспознанные варианты	PPA (%)	Нераспознанные варианты	PPA (%)	Нераспознанные варианты	PPA (%)
2,1	SNV	808	Неприменимо.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Вставка	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100

Среднее значение dCq	Тип варианта	Ожидаемые варианты	Ожидаемое значение нераспознанных вариантов	Целевое разведение VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Нераспознанные варианты	PP A (%)	Нераспознанные варианты	PP A (%)	Нераспознанные варианты	PP A (%)
2,1	Делеция	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Таблица 4. NPA для каждого количества вносимой ДНК

Среднее значение dCq	Ожидаемый дикий тип	Целевое разведение VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)	Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)	Референтное значение нераспознанных вариантов	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	> 99,9	3296	> 99,9	2996	100
7,8		3020	> 99,9	2880	> 99,9	2448	> 99,9

Аналитическая чувствительность (уровень фона [предел холостой пробы, LoB] и предел обнаружения [LoD])

Настоящее исследование было проведено для оценки уровня фона (предела холостой пробы, LoB) и предела обнаружения (LoD) модуля для соматических вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Исследование проводили с помощью репрезентативного анализа, направленного на множество генов с охватом 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. Культуры клеток проекта Platinum Genome GM12878 и GM12877 фиксировали формалином и заливали в парафин, после чего выделяли ДНК.

Образец GM12878 разводили образцом GM12877 так, чтобы частоты вариантных аллелей 74 вариантов (53 SNV, 7 вставок и 14 делеций) составляли $0,05 \pm 0,02$. Прогоны секвенирования GM12877 и разведения GM12878 (GM12878-D) начинали в шесть последовательных дней на одном приборе, чередуя две партии набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)), всего шесть прогонов секвенирования. В результате этого анализа для каждой партии реагентов получено по 60 повторностей для каждого варианта в GM12878-D и по 72 повторности для каждой соответствующей координаты дикого типа в GM12877. LoB и LoD рассчитывали, используя классический подход, как описано в CLSI EP17-A2, используя непараметрический метод. LoB и LoD рассчитывали для SNV, инсерций и делеций по отдельности путем объединения частот вариантов данного типа. Ошибку типа I определили, как 0,01, а ошибку типа II - как 0,05.

При расчете LoB объединенные частоты вариантов были отсортированы от наименьшего к наибольшему, и была рассчитана позиция 99-го ранга для каждой партии реагентов для каждого типа вариантов (таблица 5). Модуль для соматических вариантов использует отсечку (эффективный LoB) 0,026 VAF для определения качественного обнаружения вариантов. Результаты расчета LoB подтвердили, что эта отсечка приводит к ошибке типа I не более 0,01.

Таблица 5. Предел холостого образца

Тип варианта	Всего наблюдений	LoB - партия реагентов 1 (%)	LoB - партия реагентов 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Вставка	504	0,56	0,56
Делеция	1008	1,20	1,20

Для LoD был рассчитан процент частоты индивидуальных мутаций для каждой партии реагентов для каждого типа вариантов ниже отсечки 0,026 (таблица 6). Поскольку проценты были меньше, чем ошибка типа II, равная 5% (0,05), LoD рассчитывали, как медиану объединенных частот вариантов (таблица 6). Для каждого типа вариантов за LoD было принято наибольшее из двух значений, рассчитанных для двух партий реагентов: 4,97% для SNV, 5,12% для инсерций и 5,26% для делеций.

Таблица 6. Предел обнаружения (LoD)

Партия реагентов	Тип варианта	Всего наблюдений	№ измерений VAF < 2,6 %	% измерений VAF < 2,6 %	Предел определения (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Инсерция	420	6	1,4	5,08
	Делеция	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Инсерция	420	5	1,2	5,12
	Делеция	840	7	0,80	5,26

Точность

Герминальные варианты

Для оценки точности распознавания вариантов было проведено следующее исследование с использованием модуля для герминальных вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и набора реагентов ИБД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™

550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). В репрезентативном анализе, направленном на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах, тестировали 13 уникальных образцов из проекта Platinum Genome. Всего было выполнено девять прогонов с использованием трех приборов для секвенирования, трех партий реагентов тремя операторами в течение пяти первых дней. Точность в отношении SNV, инсерций и делеций определяли путем сравнения результатов с хорошо охарактеризованным композиционным референтным методом, Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Надежно установленные области определяли на основании этого референтного метода, если не указано иное.

Таблица 7. Герминальные варианты - сводные результаты по согласованности

Критерии	Всего наблюдений ¹	Результат по наблюдениям ²	Результат по прогонам ³
PPA для SNV	819	98,7	> 99,9
PPA для инсерций	819	95,0	98,9
PPA для делеций	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Рассчитывается как число образцов на прогон (91) x число прогонов (9) = 819.

²Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца в 9 прогонах.

³Наименьшее значение при анализе данных всех прогонов в совокупности.

В таблице 8 приведены данные исследования с процентом согласованности положительных и отрицательных результатов для каждого образца, результаты вариантов сравнены с данными Platinum Genomes, версия 2016-1.0, для расчетов PPA. Три типа вариантов (SNV, инсерции и делеции) объединены. Поскольку референтный метод предоставляет результаты только для вариантов с заменами и инсерциями/делециями одного нуклеотида, для расчетов NPA результаты невариантных оснований сравнивали с референтной последовательностью генома человека hg19.

Таблица 8. Герминальные варианты - согласованность для образца

Образец	Средний уровень распознавания	Ожидаемые варианты ¹	TP	F N	Нераспознанные варианты	TN	F P	PPA	NP A	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100

Образец	Средний уровень распознавания	Ожидаемые варианты ¹	TP	FN	Нераспознанные варианты	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹ Суммарное число вариантов во всех повторностях образцов в 9 прогонах.

В таблице 9 приведены данные исследования по образцам, результаты для вариантов сравнены с результатами хорошо охарактеризованного референтного композитного метода. Для каждого типа вариантов - SNV, инсерции и делеции - выявление оценивается отдельно. Референтные позиции исключены.

Таблица 9. Герминальные варианты - согласованность для образца по типу варианта

>Образец	SNV			Инсерции			Делеции		
	>Ожидаемое значение	> TP	> FN	>Ожидаемое значение	> TP	> FN	Ожидаемое значение	TP FN	
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Образцы также анализировали в отношении распознавания небольших инсерций и делеций (инделов). Сводные результаты приведены в таблице 10. Число инделов в общей сложности составило 71, их длина варьировалась от 1 до 24 п.о. для инсерций и от 1 до 25 п.о. для делеций.

Таблица 10. Сводные данные определения инделов герминальных вариантов

Тип варианта	Ожидаемые варианты	TP	FN	Нераспознанные варианты	PPA
Инсерция	18522	18018	27	477	99,9
Делеция	17388	17073	0	315	100

Репрезентативный анализ включал в себя 150 ампликонов, покрывающих области с различным геномным составом. GC-состав ампликонов варьировался в диапазоне 0,19-0,87. Ампликоны содержали повторы одного нуклеотида (т.е. поли(А), поли(Т)...), динуклеотидов и тринуклеотидов. Данные компилировали для каждого ампликона (таблица 11), чтобы определить влияние геномного состава на процент правильных распознаваний. Процент правильных распознаваний включает в себя распознанные и референтные варианты и составляет менее 100 % при наличии неправильных распознаваний или нераспознанных вариантов.

Таблица 11. Герминальные варианты - точность на уровне ампликона

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	ГС-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли А (5), Поли С (5), индел	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли Т (10), индел	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли А (5), СТ(3), ТАА (3), индел	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли А (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли Т (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли Т (5), индел	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли Т (5), Поли А (6), индел	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Индел	0,43	76167	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли Т (5), индел	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли А (5), Поли Т (5), Поли А (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли А (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли G (6), Поли Т (5), Поли А (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли А (5), индел	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли А (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли А (7), индел	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	52416	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли А (6), индел	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли Т (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	СТ(5), индел	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли Т (5), ТСТ(3), СТТ (3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли С (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли G (5), индел	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли А (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли А (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли G (5), индел	0,62	73710	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли G (6), Поли C (6), индел	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли G (7), CTC(4), индел	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли C (6), индел	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли G (5), индел	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Поли T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли A (5), Поли T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	66339	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли А (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли А (5), СА(3), индел	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли С (5), индел	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли А (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли А (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли А (5), Поли Т (7), Поли А (7), индел	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	72891	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли Т (5), индел	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли А (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли С (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли G (5), индел	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли Т (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли С (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли С (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли Т (5), индел	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли С (5), индел	0,67	71247	0	6	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли Т (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли А (13), индел (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли А (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли А (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), индел	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли Т (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли А (5), индел	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТ(3), индел	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	76986	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли Т (6), СА(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли А (6), AG(3), индел	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли Т (5), Поли А (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли Т (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли С (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли А (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Результаты секвенирования образца NA12878 сравнивали с надежно установленным Национальным институтом стандартов и технологий (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (v.2.19) генотипом NA12878. Из 150 ампликонов 92 ампликона полностью лежали в надежно установленных областях генома, 41 ампликон частично перекрывался с ними, а 17 ампликонов не перекрывались с последовательностью NIST. Это привело к 10000 координат на повторность для сравнения. Невариантные распознавания сравнивали с эталонной последовательностью генома человека, сборкой hg19. Результаты в отношении точности представлены в таблице 12.

Таблица 12. Согласованность герминальных вариантов в образце NA12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средний уровень распознавания	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

На основании данных этого исследования герминальных вариантов в 9 прогонах, секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет получать согласованные данные секвенирования при следующем составе:

- ▶ GC-состав $\geq 19\%$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах с GC-составом в 19% распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,6\%$)
- ▶ GC-состав $\leq 87\%$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах с GC-составом в 87% распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Поли-А длиной ≤ 9 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-А длиной 9, оснований распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Поли-Т длиной ≤ 10 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Т длиной 10 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Поли-G длиной ≤ 7 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-G длиной 7 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $1,0\%$)
- ▶ Поли-С длиной ≤ 6 (все распознанные основания в 2457 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-С длиной 6 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)
- ▶ Повторы динуклеотидов длиной $\leq 11x$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы динуклеотидов длиной $11x$, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,5\%$)
- ▶ Повторы тринуклеотидов длиной $\leq 5x$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторы тринуклеотидов длиной $5x$, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,5\%$)
- ▶ Вставки длиной ≤ 24 (66343 из 66370 распознанных оснований в 819 секвенированных ампликонах, содержащих инсерции длиной 24 основания, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $1,2\%$, неправильных распознаваний в областях, содержащих вставки длиной 24 нуклеотида, не было)

- Делеции длиной ≤ 25 (все распознанные основания в 2457 секвенированных ампликонах, содержащих делеции длиной 25 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания равнялся нулю)

Соматические варианты

Описываемое исследование было проведено для установления точности распознавания вариантов модулем для соматических вариантов секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx при использовании набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)).

В этом исследовании использовали репрезентативный метод, направленный на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах. ДНК выделяли из образцов FFPE проекта Platinum Genome с получением шести уникальных образцов для оценки в исследовании.

Образец ДНК GM12877 разводили образцом ДНК GM12878 для получения GM12877-D5 и GM12877-D7 как набора уникальных гетерозиготных вариантов с вариантами частот около 5% и 7%. Образец ДНК GM12878 аналогичным образом разводили образцом ДНК GM12877 для получения GM12878-D5 и GM12878-D7. Каждый из образцов тестировали в трех повторностях, за исключением разведенных образцов, которые тестировали в шести повторностях. Всего было выполнено девять прогонов с использованием трех приборов для секвенирования, трех партий реагентов тремя операторами в течение пяти первых дней. Точность в отношении SNV, инсерций и делеций определяли путем сравнения результатов с хорошо охарактеризованным композиционным референтным методом, Platinum Genomes, версия 2016-1.0. Надежно установленные области определяли на основании этого референтного метода, если не указано иное.

Таблица 13. Соматические варианты - сводные данные по согласованности

Критерии	Всего наблюдений ¹	Результат по наблюдениям ²	Результат по прогонам ³
PPA для SNV	378	98,9	99,9
PPA для инсерций	378	96,9	99,9
PPA для делеций	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Рассчитывается как число образцов на прогон (42) x число прогонов (9) = 378.

²Наименьшее наблюдаемое значение для повторностей образца в 9 прогонах.

³Наименьшее значение при анализе данных всех прогонов в совокупности.

В таблице 14 приведены данные исследования в отношении процентной согласованности положительных и отрицательных результатов по образцам, результаты для вариантов сравнены с результатами хорошо охарактеризованного референтного метода. Три типа вариантов (SNV, инсерции и делеции) объединены. Поскольку референтный метод предоставляет результаты только для вариантов с заменами и инсерциями/делециями одного нуклеотида, для расчетов NPA результаты невариантных оснований сравнивали с референтной последовательностью генома человека hg19.

Таблица 14. Соматические варианты - согласованность для образца

Образец	Средний уровень распознавани я	Ожидаемо е значение	TP	F N	Нераспознанны е варианты	TN	F P	PP A	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	202 5	0	27	31868 2	15	100	> 99, 9	> 99, 9
GM12878	98,8	3645	356 4	0	81	31764 5	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	253 8	0	54	32361 4	2	100	> 99, 9	> 99, 9
GM12884	99,8	3078	302 4	0	54	32203 8	5	100	> 99, 9	> 99, 9
GM12885	99,8	3294	321 3	0	81	32212 1	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	288 9	0	27	32304 8	2	100	> 99, 9	> 99, 9
GM12877 -D5	99,8	9288	893 0	0	358	63062 1	0	100	100	100
GM12877 -D7	99,7	9288	903 2	0	256	62971 9	0	100	100	100
GM12878 -D5	99,5	9288	869 9	42	547	62858 2	0	99,5	100	> 99, 9
GM12878 -D7	99,7	9288	910 8	0	180	62980 3	0	100	100	100

В таблице 15 приведены данные исследования по образцам, результаты для вариантов сравнены с результатами хорошо охарактеризованного референтного метода. Для каждого типа вариантов - SNV, инсерции и делеции - выявление оценивается отдельно. Референтные позиции исключены.

Таблица 15. Соматические варианты - согласованность для образца по типам вариантов

Образец	SNV			Инсерции			Делеции		
	Ожидаемо е значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемо е значение	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Десять образцов далее анализировали в отношении распознавания небольших инсерций и делеций (инделов) (таблица 16). Число инделов в общей сложности составило 71, их длина варьировалась от 1 до 24 п.о. для инсерций и от 1 до 25 п.о. для делеций.

Таблица 16. Сводные данные - соматические варианты, выявление инделов

Тип варианта	Ожидаемые варианты	TP	FN	Нераспознанные варианты	PPA
Инсерция	10773	10282	9	482	99,2
Делеция	11502	10667	5	830	> 99,9

Для покрытия областей с различным геномным составом были разработаны 150 ампликонов. GC-состав ампликонов варьировался в диапазоне 0,19-0,87. Ампликоны также содержали повторы одного нуклеотида (т.е. поли(А), поли(Т)...), динуклеотидов и тринуклеотидов. Данные компилировали для каждого ампликона (таблица 17), чтобы определить влияние геномного состава на процент правильных распознаваний. Процент правильных распознаваний включает в себя распознанные и референтные варианты и составляет менее 100 % при наличии неправильных распознаваний или нераспознанных вариантов.

Таблица 17. Соматические варианты - точность на уровне ампликона

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли А (5), ПолиС (5), индел	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли Т (10), индел	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли А (5), СТ(3), ТАА (3), индел	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли А (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли Т (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли Т (5), индел	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли Т(5), поли А(6), индел	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли Т (5), индел	0,42	27459	0	136	99,5

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли А (5), ПолиТ (5), Поли А (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли А(6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли G (6), Поли Т (5), Поли А (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли А (5), индел	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли А (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли А (7), индел	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли А (6), индел	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли Т (5)	0,37	25277	0	55	99,8

Амплико н	Хромосо ма	Начало ампликон а	Конец амплико на	Размер анализируемо го фрагмента	Основания в надежно установленн ых областях	Геномны й состав амплико на	GC- соста в	Правильное распознаван ие	Неправильн ое распознаван ие	Не распозна но	% правильных распознаван ий
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	СТ(5), индел	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли Т (5), ТСТ(3), СТТ(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли С (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли G (5), индел	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли А (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли А (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли G (5), индел	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли G (6), Поли С (6), индел	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	24901	0	47	99,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли G (7), СТС(4), индел	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли С (6), индел	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли G (5), индел	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Поли Т (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли А (5), ПолиТ (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), индел	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	38546	0	10	> 99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли А (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли А (5), СА(3), индел	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли С (5), индел	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли А (7), АС(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли А (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли А (5), ПолиТ (7), Поли А (7), индел	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	31360	0	22	99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли Т (5), индел	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли А (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли С (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли G (5), индел	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли Т (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли С (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли С (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли Т (5), индел	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли С (5), индел	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли Т (5)	0,54	33553	0	89	99,7

Амплико н	Хромосо ма	Начало ампликон а	Конец амплико на	Размер анализируемо го фрагмента	Основания в надежно установленн ых областях	Геномны й состав амплико на	GC- соста в	Правильное распознаван ие	Неправильн ое распознаван ие	Не распозна но	% правильных распознаван ий
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли А (13), индел (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли А (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли А(7), АТ(3), АТ (4), АТ(4), индел	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли Т (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А(6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли А (5), индел	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	СТ(3), индел	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	28686	0	42	99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли A(6), AG(3), индел	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли T (5), Поли A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в надежно установленных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Правильное распознавание	Неправильное распознавание	Не распознано	% правильных распознаваний
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли А (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Результаты секвенирования образца GM12878 сравнивали с надежно установленным Национальным институтом стандартов и технологий (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (v.2.19) генотипом NA12878. Из 150 ампликонов 92 ампликона полностью лежали в надежно установленных областях генома, 41 ампликон частично перекрывался с ними, а 17 ампликонов не перекрывались с последовательностью NIST. Это привело к 10000 координат на повторность для сравнения. Невариантные распознавания сравнивали с эталонной последовательностью генома человека, сборкой hg19. Результаты в отношении точности представлены в таблице 18.

Таблица 18. Согласованность соматических вариантов в образце GM12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средний уровень распознавания	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

На основании данных этого исследования соматических вариантов в 9 прогонах, секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx позволяет получать согласованные данные секвенирования при следующем составе:

- ▶ GC-состав $\geq 19\%$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах с GC-составом в 19% распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $2,6\%$)
- ▶ GC-состав $\leq 87\%$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах с GC-составом в 87% распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,6\%$)
- ▶ Поли-А длиной ≤ 9 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-А длиной 9 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $2,5\%$)
- ▶ Поли-Т длиной ≤ 10 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Т длиной 10 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,1\%$)
- ▶ Поли-Г длиной ≤ 6 (все распознанные основания в 2268 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-Г длиной 7 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,5\%$)
- ▶ Поли-С длиной ≤ 6 (все распознанные основания в 756 секвенированных ампликонах, содержащих повторы поли-С длиной 6 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,4\%$)
- ▶ Повторы динуклеотидов длиной $\leq 4x$ (все распознанные основания в 1890 секвенированных ампликонах, содержащих повторы динуклеотидов длиной $4x$, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,9\%$)
- ▶ Повторы тринуклеотидов длиной $\leq 5x$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторы тринуклеотидов длиной $5x$, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $1,4\%$)
- ▶ Инделы длиной ≤ 23 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих инделы длиной 23 основания, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,8\%$)
- ▶ Делеции длиной ≤ 25 (все распознанные основания в 1134 секвенированных ампликонах, содержащих делеции длиной 25 оснований, распознаны правильно, уровень нераспознавания составил $0,7\%$)

Прецизионность

Прецизионность секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx определяли путем

тестирования 13 уникальных образцов проекта Platinum Genome с использованием трех приборов, трех партий реагентов тремя операторами при генерировании девяти последовательностей за пять дней прогонов. Репрезентативный анализ, образцы и референтный метод - те же, как описано для исследования точности при анализе герминальных вариантов. Прецизионность определяли с помощью дисперсионного анализа компонентов с использованием VAF в качестве переменной отклика и расчета стандартных отклонений на уровне компонентов для прибора, партии реагентов, оператора и дня начала прогона (таблица 19). Общее число наблюдений, использованных в анализе для каждого компонента изменчивости инструмента, оператора и партии реагента, составило 699, 176 и 235 для SNV, инсерций и делеций, соответственно.

Таблица 19. Результаты анализа прецизионности секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (стандартное отклонение)

Компонент	Тип варианта	Компонент SD		Всего SD	
		Max	Медиана	Max	Медиана
Партия	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Инсерция	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Делеция	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Прибор	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Инсерция	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Делеция	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Оператор	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Инсерция	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Делеция	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
День	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Инсерция	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Делеция	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Сравнение методов (платформ для секвенирования)

Образцы из цельной крови и FFPE оценивали на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx и генетическом секвенаторе MiSeqDx с использованием протоколов для герминальных и соматических вариантов набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения. Согласованность в отношении частоты вариантов для образцов крови и FFPE оценивали при использовании нескольких репрезентативных анализов. На рисунке 15 показана корреляция VAF между двумя приборами для одного репрезентативного анализа, а в таблице 20 показана корреляция по панели анализа. На основании сильной корреляции между генетическим секвенатором MiSeqDx и секвенатором нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx рабочие характеристики, связанные с преаналитическими факторами (в т.ч. методами выделения или присутствием посторонних веществ), определены как применимые к обоим приборам. Дополнительную информацию см. в инструкции по применению для набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения.

Рисунок 15. Корреляция VAF генетического секвенатора MiSeqDx и секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx для образцов FFPE (слева) и крови (справа) при использовании метода 1

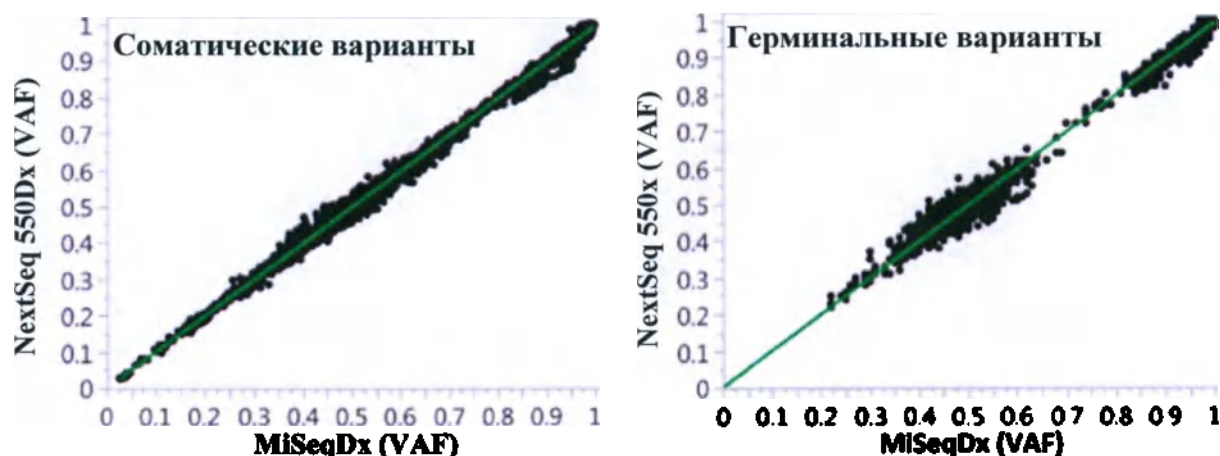


Таблица 20. Сравнение результатов метода при использовании уникальных образцов крови и FFPE

Источник гДНК	Анализ (панель олигонуклеотидов)	Биологическое повторности (образцы)	Техническое повторности (на образец)	Наблюдения (число вариантов)	Наклон	Точка пересечения	Корреляция (R^2)
Кровь	Анализ 1	45	2	83691	0,992	0,002	0,9952
Кровь	Анализ 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Анализ 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,9972
FFPE	Анализ 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹ Два значения были удалены на основании указанного ограничения для модуля герминальных вариантов.

² Коэффициент смешанной корреляции для графиков VAF, как показано на рисунке 15.

Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов, полученных с помощью секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx оценивали при тестировании образцов Platinum Genome с помощью репрезентативного анализа, направленного на множество генов с охватом 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах. Тестирование герминальных вариантов включало семь повторностей 13 образцов; исследование соматических вариантов - шесть повторностей семи образцов разных VAF. Образцы готовили с использованием набора реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот ИВД TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx, в вариантах исполнения.

Тестирование проводили в трех внешних лабораториях с использованием одной партии набора реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2, 300 циклов (NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)). В каждой лаборатории использовали один секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. В каждой лаборатории исследования проводили два оператора. Каждый оператор выполнил тестирование в течение трех не последовательных дней начала прогона для каждого типа образца, в общей сложности 36 прогонов в трех лабораториях. В результате этого тестирования было проведено 18 прогонов для каждого протокола (для герминальных и соматических вариантов).

Герминальные варианты

Герминальные варианты с $VAF \geq 0,2$ сообщаются как положительные (вариант). Для ожидаемых положительных герминальных вариантов данные оценивали для уровней

нераспознавания и правильного положительного распознавания для каждого типа варианта (SNV, инсерция, делеция). В таблице 21 приведены наблюдаемые уровни вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона для каждого типа варианта.

Таблица 21. Наблюдения распознавания герминальных вариантов для ожидаемых положительных результатов по типу варианта

Тип варианта	Не распознано			Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Инсерции	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Делеции	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Герминальные варианты с уровнями VAF $< 0,2$ сообщаются как отрицательные (дикого типа). Для ожидаемых отрицательных позиций герминальных вариантов данные оценивали для уровней нераспознавания и правильного распознавания дикого типа. В таблице 22 приведены наблюдаемые уровни вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона.

Таблица 22. Наблюдения распознавания герминальных вариантов для ожидаемых отрицательных результатов

Тип варианта	Не распознано			Правильное отрицательное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
Дикий тип	4883	19600182	0,025	19595299	19595299	100	100,00	100,00

Герминальные варианты с VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ расцениваются как положительные гетерозиготные по варианту, а варианты с уровнем VAF $\geq 0,7$ - как положительные гомозиготные по варианту. Для определения того, повлияет ли внутренняя вариабельность метода на распознавание генотипа, использовали образцы с гетерозиготными герминальными вариантами. Сх определяли для обоих отсечений (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов), где x - доля повторных тестов, значения которых превышают уровень отсечения. Для нижнего отсечения, 0,2 VAF, Сх был $\geq 99,999\%$, что указывает на то, что 99,999% гетерозиготных вариантов будут расценены как гетерозиготные. Для верхнего отсечения, 0,7 VAF, Сх был $\leq 0,001\%$, что указывает на то, что $\leq 0,001\%$ гетерозиготных вариантов будут расценены как гомозиготные. В таблице 22 результаты обобщены по типу вариантов.

Герминальные варианты с VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ расцениваются как положительные гетерозиготные по варианту, а варианты с уровнем VAF $\geq 0,7$ - как положительные гомозиготные по варианту. Для определения того, повлияет ли внутренняя вариабельность метода на распознавание генотипа, использовали образцы с гетерозиготными герминальными вариантами. Сх определяли для обоих отсечений (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов), где x - доля повторных тестов, значения которых превышают уровень отсечения. Для нижнего отсечения, 0,2 VAF, Сх был $\geq 99,999\%$, что указывает на то, что $\geq 99,999\%$ гетерозиготных вариантов будут расценены как гетерозиготные. Для верхнего отсечения, 0,7 VAF, Сх был $\leq 0,001\%$, что указывает на то, что $\leq 0,001\%$ гетерозиготных вариантов будут расценены как гомозиготные. В таблице 23 результаты обобщены по типу вариантов.

Таблица 23. Герминальные варианты - значения S_x для гетерозиготных вариантов

Тип варианта	Отсечка при 0,2 VAF	Отсечка при 0,7 VAF
	$\geq C99,999 \%$	$\leq C0,001 \%$
SNV	94/94	94/94
Инсерции	24/24	24/24
Делеции	35/35	35/35
Всего	153	153

Соматические варианты

Соматические варианты с $VAF \geq 0,026$ сообщаются как положительные (вариант). Наблюдения с уровнями $VAF \geq 0,01$ и $< 0,026$ считались сомнительными в отношении целей данного анализа (ни положительными, ни отрицательными, помеченными как варианты с низкой частотой). Для оценки рабочих характеристик результаты рассчитывали тремя способами:

- ▶ Наилучший случай: любой сомнительный результат считался правильным положительным распознаванием (соответствие ожидаемому результату)
- ▶ Наихудший случай: любой сомнительный результат считался неправильным распознаванием (несоответствие ожидаемому результату)
- ▶ Случай с исключением: все сомнительные результаты исключали из анализа.

В трех таблицах, таблице 24, таблице 25 и таблице 26, обобщены результаты распознавания для наилучшего случая, наихудшего случая и случая с исключением, соответственно, вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона.

Таблица 24. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых положительных результатов (наилучший сценарий)

Тип варианта	Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица 25. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых положительных результатов (наихудший сценарий)

Тип варианта	Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица 26. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых положительных результатов (исключение сомнительных распознаваний)

Тип варианта	Правильное положительное распознавание				
	Полученный результат	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Соматические варианты с $VAF < 0,01$ сообщаются как отрицательные (дикого типа). Для ожидаемых отрицательных позиций соматических вариантов данные оценивали для

уровней нераспознавания и правильного распознавания дикого типа. Правильные распознавания дикого типа определяли путем исключения нераспознаваний и вычитания наблюдаемых распознаваний, попавших в сомнительную зону (уровни $VAF \geq 0,01$ и $<0,026$), а также неправильных распознаваний выше отсечения (уровни $VAF \geq 0,026$) из общего числа. В таблице 27 обобщены наблюдаемые результаты, всего и в процентах, для отрицательных позиций соматических вариантов для уровня нераспознавания и правильного распознавания дикого типа вместе с нижней и верхней границами 95% доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанными с использованием метода Уилсона.

Таблица 27. Наблюдения распознавания соматических вариантов для ожидаемых отрицательных результатов

Тип варианта	Не распознано			Правильное распознавание						
	Полученный результат	Всего	Процент	Сомнительные результаты	Неправильно	Правильно	Всего	Процент	95 % LCL	95 % UCL
Дикий тип	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,97 2	99,97 4

Для определения C95 анализа (в пределах каждого типа варианта) оценивали образцы соматических вариантов с разными VAF. Для оценки изменчивости вблизи отсечения использовали образцы с ожидаемыми VAF между 0,02 и 0,07. C95 определяли для каждого варианта, наивысшее значение C95 для каждого типа вариантов представлено в таблице 28.

Таблица 28. Соматические варианты - сводные результаты по C95

Тип варианта	N	C95
SNV	74	0,0613
Инсерция	24	0,0573
Делеция	33	0,0575

Данные из Инструкции по применению на Систему VeriSeq™ NIPT Solution v2

Следующие данные, приведенные в разделах, посвященных клиническим и аналитическим характеристикам, были получены с использованием протоколов и материалов, описанных в инструкциях по применению, начиная с полученной плазмы. Все данные секвенирования для данного раздела были получены с использованием секвенаторов нуклеиновых кислот NextSeq™ 500/550 или Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx методом секвенирования нового поколения (NGS) при следующих параметрах:

Таблица 29.

	NextSeq™ 500/550	NextSeq™ 550Dx
Встроенное ПО	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Версия набора реагентов	Набор реагентов ИВД NextSeq™ 500/550 v2.5, 75 циклов	Набор реагентов ИВД NextSeq™ 550Dx v2.5, 75 циклов
Метод секвенирования	Парно-концевое секвенирование 2×36 в режиме высокого выхода	Парно-концевое секвенирование 2×36 в режиме высокого выхода

Клиническое исследование

Клиническая точность результатов исследования системы неинвазивного пренатального тестирования для определения множественных врожденных анеуплоидий ИВД VeriSeq™ NIPT Solution v2, анализ нуклеиновых кислот была показана путем оценки образцов плазмы,

собранных у беременных женщин с одноплодными и двуплодными беременностями. Обезличенные образцы плазмы были получены из биобанка, где материал сохранялся после отделения из образцов периферической цельной крови. В исследование было включено 45000 образцов от пациентов, прошедших пренатальный скрининг на хромосомные анеуплоидии плода и частичные делеции и дупликации размером не менее 7 МБ. Все образцы от беременностей с патологией плода и ряд последующих образцов от беременностей без патологии подходили для тестирования при наличии доступных клинических исходов и соответствии критериям для выборки. В общей сложности были проанализированы свыше 2335 образцов. Из них 2328 образцов относились к одноплодной беременности, а семь остальных — к двуплодной.

Из этих образцов 28 (1,2%, 28/2335) не прошли КК по результатам анализа данных, полученных при первом секвенировании:

1. 27 не прошли оценку iFACT (один с ХО, 26 - без патологий)
2. В одном образце значения данных выходили за пределы ожидаемого диапазона

Демографические показатели и показатели беременности

Возраст женщины, срок и триместр беременности для образцов полногеномного скрининга (включая известные мозаичные образцы) приведены в таблице 30.

Оценка демографических показателей проводилась среди базовых и полногеномных когорт и не показала статистически значимого расхождения. Демографические показатели и показатели беременности были сходными независимо от того, были включены известные мозаичные образцы или нет.

Таблица 30. Демографические показатели и показатели беременности

Сводные статистические данные	Полногеномный (включая известные мозаичные образцы)
Количество образцов	2307*
Возраст женщины - годы	
Среднее	35,08
Стандартное отклонение	4,04
Медиана	34,95
25-й процентиль, 75-й процентиль	32,31; 37,79
Минимум, максимум	20,22; 53,02
Срок беременности в момент взятия крови - недели	
Среднее	10,93
Стандартное отклонение	1,20
Медиана	10,57
25-й процентиль, 75-й процентиль	10,29; 11,14
Минимум, максимум	10,00; 27,86
Триместр беременности - п (%)	
Первый (< 14 недель)	2,252 (98%)
Второй	54 (2%)
Третий (> 27 недель)	1 (0%)

* Финальный выборка содержала 7 двуплодных беременностей.

Клинические характеристики

Результаты, полученные с помощью системы VeriSeq™ NIPT Solution v2, сравнивали с результатами стандартной клинической оценки исходов беременности. Для всех

исследуемых образцов имелись результаты стандартной клинической оценки (клиническая «истина») в отношении хромосомной анеупloidии плода и частичной делеции и дупликации не менее 7 МБ. Стандартная клиническая оценка для включенных в исследование образцов зависела от результатов хромосомного анализа или физического обследования новорожденных с отрицательными результатами НИПТ, основанного на секвенировании NGS. Подготовленный исследовательский персонал выполнил классификацию данных стандартной клинической оценки в соответствии с документацией по медицинскому кодированию, предоставленной спонсором.

Хромосомный анализ был проведен методами стандартного цитогенетического кариотипирования, флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) или хромосомным микроматричным анализом (ХМА). В качестве материала для хромосомного анализа были использованы образцы периферической цельной крови или слюны новорожденных и младенцев, образцы продукты зачатия (РОС), амниоцитов, ворсин хориона, плацентарной ткани или послеродовой пуповинной крови.

Мозаицизм определяется как представленность двух или более клеточных линий, каждая из которых имеет отличный от других хромосомный набор. Клеточные линии происходят из одной и той же зиготы. Тип и уровень мозаицизма бывают разные и зависят от сроков возникновения мозаичного события во время эмбриогенеза и развития плода. Различные типы мозаицизма обнаруживаются в ходе пренатальной диагностики в зависимости от распределения аномальных клеточных линий относительно нормальных в клетках трофобласта, мезенхиме или плода. Хотя мозаицизм можно обнаружить в любой хромосоме, он чаще встречается среди редких аутосомных анеупloidий (РАА), чем при трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам (Т21, Т18 и Т13). При проведении оценки характеристик теста случаи мозаицизма были включены в полногеномный анализ, поскольку данный тип скрининга позволяет обнаружить РАА.

Характеристики базового скрининга

Режим базового скрининга включает выявление аномалий Т21, Т18 и Т13. Анализ был проведен в общей сложности на 2243 образцах, отобранных при одноплодной и двуплодной беременности. Во всех семи случаях двуплодной беременности были правильно определены случаи трисомии по хромосоме 21 (Т21), которые не указаны в следующей таблице.

Таблица 31. Чувствительность и специфичность системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 в отношении выявления трисомии по хромосомам 21, 18 и 13 при базовом скрининге для одноплодной беременности (за исключением известных случаев мозаицизма)

	T21	T18	T13
Чувствительность	> 99,9% (130/130)	> 99,9% (41/41)	> 99,9% (26/26)
2-сторонний 95% ДИ	97,1%; 100%	91,4%; 100%	87,1%; 100%
Специфичность	99,90% (1982/1984)	99,90% (1995/1997)	99,90% (2000/2002)
2-сторонний 95% ДИ	99,63%; 99,97%	99,64%; 99,97%	99,64%; 99,97%

Характеристики анализа на основном экране, как показано в табл. 31, рассчитаны без учета набора из 64 образцов с РАА, частичными аутосомальными делециями или дупликациями

или известными типами мозаицизма. Эти 64 образца включали восемь случаев мозаицизма T21 и три - T18. Пять из этих 11 образцов были идентифицированы программным обеспечением VeriSeq™ NIPT v2 (VeriSeq™ NIPT Assay Software v2) как образцы с аномалиями.

Характеристики полногеномного скрининга

Для полногеномного скрининга в число отклонений входят трисомии, моносомии, а также частичные делеции или дупликации не менее 7 МБ. Среди образцов для полногеномного скрининга было 36 образцов с известными случаями мозаицизма. Анализ был проведен в общей сложности на 2307 образцах, отобранных при одноплодной и двуплодной беременности. Во всех семи случаях двуплодной беременности были правильно выявлены отклонения в хромосоме 21, которые не указаны в следующих таблицах.

Характеристики полногеномного скрининга для любых аномалий

Таблица 32. Чувствительность и специфичность системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 в отношении выявления любых аномалий при полногеномном скрининге (включая известные случаи мозаицизма)

	Чувствительность	Специфичность
Оценка % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1954/1967)
2-сторонний 95% ДИ	92,7%; 97,3%	98,87%; 99,61%

Характеристики полногеномного скрининга для редких аутосомных анеуплоидий (РАА)

Таблица 33. Чувствительность и специфичность системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 в отношении редких аутосомных анеуплоидий (РАА) при полногеномном скрининге (включая известные случаи мозаицизма)

	Чувствительность	Специфичность
Оценка % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2001/2005)
2-сторонний 95% ДИ	82,3%; 99,4%	99,49%; 99,92%

Характеристики полногеномного скрининга для частичных делеций и дупликаций

Таблица 34. Чувствительность и специфичность системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 в отношении частичных делеций и дупликаций размером от 7 МБ при полногеномном скрининге (включая известные случаи мозаицизма)

	Чувствительность	Специфичность
Оценка % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2000/2004)
2-сторонний 95% ДИ	55,3%; 86,8%	99,49%; 99,92%

Различия характеристик режимов базового и полногеномного скрининга

Методология оценки для общих трисомий и анеуплоидий половых хромосом одинакова в режиме базового и полногеномного скрининга. При базовом скрининге применяется только алгоритм выявления T21, T18 и T13. При полногеномном скрининге та же методология

распространяется на все случаи трисомии и РАА, а также на частичные дупликации и делеции.

Существует два основных различия между описанными характеристиками базового и полногеномного скрининга. Во-первых, при полногеномном скрининге оценивались показатели образцов с известным мозаицизмом как для общих трисомий, так и для РАА и частичных делеций и дупликаций. Во-вторых, в режиме полногеномного скрининга могут преимущественно выявляться частичные дупликации, а не полные трисомии. Наличие полной трисомии в дополнение к частичной дупликации или делеции можно уточнить по значениям LLR, приведенным в дополнительном отчете

Включение случаев мозаицизма в режим полногеномного скрининга

Мозаицизм включен в список ограничений методики анализа. При наличии мозаицизма сигнал от плодной ДНК при аномалии уменьшается, и, следовательно, его может быть сложнее обнаружить без ущерба для общей специфичности анализа. Однако, поскольку мозаицизм актуален для расширенного спектра образцов, образцы с мозаицизмом были включены в анализ в режиме полногеномного скрининга.

Из 64 образцов, включенных в анализ в полногеномном режиме, без использования базового скрининга, 36 образцов были идентифицированы по клиническому эталонному стандарту диагностики как имеющие мозаицизм. Для 23 из этих 36 образцов результат скрининга совпал с эталонной клинической оценкой.

Выявление частичной делеции или дупликации в сравнении с выявлением полнохромосомных анеуплоидий

В меню системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 есть параметры для базового и полногеномного скрининга. При выполнении базового скрининга результат ANOMALY DETECTED (ОБНАРУЖЕНА АНОМАЛИЯ) сообщается только в том случае, когда полная анеуплоидия обнаруживается для 21, 18 или 13 хромосом и при этом все показатели КК соблюдены. При полногеномном скрининге система обнаруживает анеуплоидии во всех аутосомах и в случаях частичных делеций и дупликаций размером от 7 МБ.

При полногеномном скрининге система задает приоритет сообщения о случаях частичной делеции или дупликации при анализе всей хромосомы, если размер частичной делеции или дупликации охватывает не более 75% размера хромосомы, в которой обнаружен такой случай. Если обнаруженная область частичной делеции или дупликации составляет более 75% размера хромосомы, то такой случай указывается как полная трисомия или моносомия всей хромосомы. Поэтому очень большие частичные делеции и дупликации, размер которых составляет менее 75% от размера хромосомы, могут указывать на анеуплоидию всей хромосомы.

Для всех образцов в дополнительном отчете отражен показатель LLR для классификации всей хромосомы. Перед интерпретацией результатов необходимо проанализировать показатель LLR в отношении заданного порогового значения (рисунок 17). Показатели LLR, относящиеся к хромосомному уровню, превышающие пороговое значение, способствуют последующей интерпретации в пользу анеуплоидии всей хромосомы.

В ходе клинического исследования было обнаружено два образца одноплодной беременности с дупликациями значительными размера (одна на 21-й хромосоме и одна на 18-й), которые составляли менее 75% относительного размера хромосомы (см. таблицу 35).

Оба случая были указаны как частичные дупликации, а не как полная трисомия соответствующей хромосомы. Показатели LLR для этих случаев превышали предел, соответствующий результатам для полной трисомии. В случае положительного результата НИПТ как для частичной дупликации, так и при полной трисомии хромосомы, следует предложить пациенту пройти подтверждающую пренатальную диагностику.

Таблица 35. Примеры значительных частичных дупликаций, обнаруженных при полногеномном скрининге

	Клиническая «истина»	Результат полногеномного скрининга	Размер аномалии (МБ)	% хромосомы	Показатели LLR
Образец 1	Трисомия по 21 хромосоме, одноплодн.	Частичная дупликация 21 хромосомы	22,50	48,9	19,43
Образец 2	Трисомия по 18 хромосоме, одноплодн.	Частичная дупликация 18 хромосомы	47,00	60,2	12,99

Дополнительные сведения о показателях КК, используемых для формирования отчета по результатам обнаружения анеуплоидии, см. в «Руководстве для программного обеспечения» (документ № 1000000067940).

Половые хромосомы

Результаты, полученные с помощью системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 для половых хромосом, были проанализированы в сравнении со стандартными клиническими результатами исходов беременности и объединены в таблице ниже. Процент совпадений был рассчитан для каждой половой хромосомы в рамках результата каждого клинического исхода беременности. Процент совпадений рассчитывали, как число образцов, в которых результаты для половых хромосом, полученные посредством системы VeriSeq™ NIPT Solution v2, совпадали с результатами стандартной клинической оценки, деленное на общее число образцов с такими же результатами стандартной клинической оценки.

Таблица 36. Процент совпадений для классификации пола плода*

Классификация пола плода		Фенотип в результате осмотра новорожденного		Результаты цитогенетического исследования							Отсутствует
Обнаружение анеуплоидии	Кариотип	Женский пол	Мужской пол	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Прочее**	
Аномалий не обнаружено	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Аномалий не обнаружено	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Аномалия обнаружена	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Аномалия обнаружена	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Аномалия обнаружена	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Аномалия обнаружена	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Итого		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Процент совпадений		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Не применимо	Не применимо

* В пяти случаях двуплодной беременности было правильно установлено наличие Y-хромосомы. В двух случаях было правильно установлено отсутствие Y-хромосомы.

** Другими результатами цитогенетического исследования были XXXXX и XXYY.

Прогностическая ценность положительного и отрицательного результата системы VeriSeq™ NIPT Solution v2

Прогностическая ценность положительного результата (PPV) и прогностическая ценность отрицательного результата (NPV) дают информацию по возможности принимать клинические решения на основании чувствительности и специфичности исследования и вероятности до тестирования, что у плода имеется трисомия (распространенность). Поскольку PPV и NPV зависят от распространенности, а распространенность этих анеуплоидий может различаться в разных популяциях, PPV и NPV рассчитывали на основе чувствительности и специфичности, наблюдавшихся при базовом скрининге (без известных случаев мозаицизма) в исследовании клинической точности. Таблица 40 составлена на основе данных полногеномного скрининга (без известных случаев мозаицизма).

Таблица 37. Распространенность, PPV и NPV для трисомии по 21 хромосоме при базовом скрининге (без известных случаев мозаицизма)

Распространенность (%)	PPV (%)	NPV (%)
0.05	33.17	> 99.99
0.10	49.82	> 99.99
0.20	66.53	> 99.99
0.50	83.29	> 99.99
1.00	90.93	> 99.99
1.50	93.79	> 99.99
2.00	95.29	> 99.99

Таблица 38. Распространенность, PPV и NPV для трисомии по 18 хромосоме при базовом скрининге (без известных случаев мозаицизма)

Распространенность (%)	PPV (%)	NPV (%)
0.03	23.06	> 99.99
0.05	33.31	> 99.99
0.10	49.99	> 99.99
0.20	66.68	> 99.99
0.30	75.03	> 99.99
0.40	80.04	> 99.99
0.50	83.38	> 99.99

Таблица 39. Распространенность, PPV и NPV для трисомии по 13 хромосоме при базовом скрининге (без известных случаев мозаицизма)

Распространенность (%)	PPV (%)	NPV (%)
0.01	9.10	> 99.99
0.02	16.68	> 99.99
0.05	33.37	> 99.99
0.10	50.05	> 99.99
0.20	66.73	> 99.99

Таблица 40. Распространенность, PPV, NPV и любой другой аномалии при полногеномном скрининге (включая известные случаи мозаицизма)

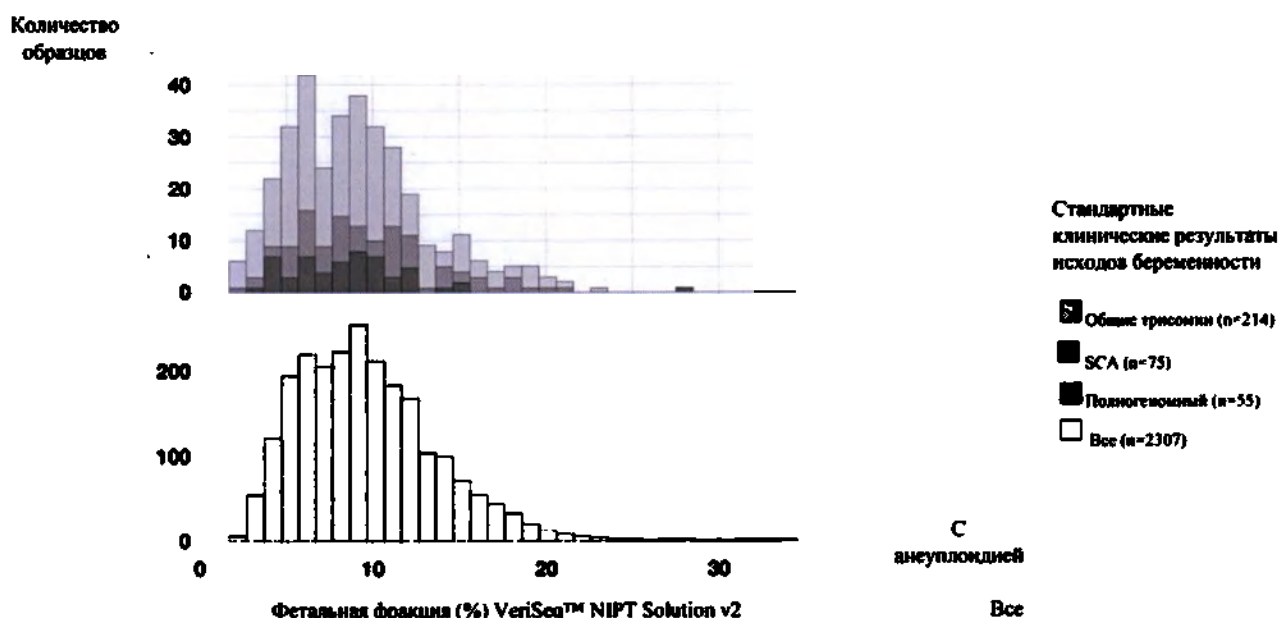
Распространенность (%)	PPV (%)	NPV (%)
0.01	1.42	> 99.99
0.02	2.81	> 99.99
0.05	6.74	> 99.99
0.10	12.64	> 99.99
0.20	22.45	99.99
0.50	42.07	99.98

1.00	59.34	99.95
1.50	68.75	99.93
2.00	74.68	99.91

Распределение фетальной фракции

Распределение рассчитанной фетальной фракции, полученное с помощью системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 для полногеномного скрининга, включая образцы с известным мозаицизмом, отражено с данными стандартных клинических результатов исходов беременности на рисунке 16.

Рисунок 16. Распределение фетальной фракции



У 5 образцов наблюдались отклонения в нескольких категориях.

Образцы общей трисомии включают в себя образцы с трисомиями по 21, 18 и/или 13 хромосомам.

Полногеномные образцы включают в себя образцы с PAA или частичными делециями и/или дупликациями.

Оценки фетальной фракции в диапазоне от 2% до 34% с медианой 9%, а также в вероятностном диапазоне от 6% до 12%. Медиана оценки фетальной фракции для общих трисомий и случаев, обнаруженных при полногеномном скрининге, составляет 8%, а для SCA — 9%. Диапазон оценок фетальной фракции соответствовал всем результатам. Отсутствуют какие-либо видимые сдвиги в распределении фетальной фракции среди случаев общей трисомии, SCA, случаев, обнаруженных при полногеномном скрининге, или всех образцов при полногеномном анализе.

Характеристики при двуплодной беременности

Оценка трисомии по 13, 18 и 21 хромосомам и характеристики Y-хромосомы при двуплодной беременности

Из-за низкой распространенности трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам при двуплодной беременности, только незначительное число аномальных образцов были доступны для проведения клинического исследования. Для оценки характеристик системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 при двуплодной беременности использовались *in silico* модели, основанные на результатах исследованных клинических образцов, позволившие

имитировать популяцию с двуплодной беременностью. Моделирование соответствовало популяции для которой предполагалось применение. Распределение фетальной фракции было определено с использованием примерно 4500 образцов двуплодной беременности и было сравнено с распределением для примерно 120000 образцов одноплодной беременности. Распределение фетальной фракции, обусловленное анеуплоидией, было определено на основе предполагаемых результатов для одноплодной беременности (1044 случая трисомии по 21 хромосоме, 307 случаев трисомии по 18 хромосоме и 192 случая трисомии по 13 хромосоме). Объединение двух распределений позволило сделать выводы об обнаружении анеуплоидии при двуплодной беременности. Моделировались наборы dizиготных и монозиготных близнецов, и для оценки чувствительности было взято средневзвешенное значение, представляющее их распространенность в предполагаемой популяции (2 dizиготных: 1 монозиготный). Для оценки специфичности были смоделированы наборы близнецов без отклонений в хромосомном наборе.

Фракция каждого смоделированного образца с трисомией (т. е. пораженная фракция) рассчитывалась отдельно для каждой категории образцов:

- В случае монозиготных близнецов для пораженной фракции каждого образца задавалось значение 1,0, поскольку в такой ситуации трисомия поражала обоих близнецов.
- В случае dizиготных близнецов предполагалось, что отклонения наблюдались только у одного из близнецов (крайне редко поражаются оба dizиготных близнеца). Были смоделированы значения пораженной фракции с использованием известного распределения отношений фетальной фракции, рассчитанной на основе клинических образцов разнополой двойни. Использовался консервативный подход, который подразумевал, что у пораженного близнеца фетальная фракция всегда ниже, чем у второго близнеца. В случае беременности плодами с трисомией по 13 и 18 хромосомам фетальная фракция в среднем была ниже, поэтому применялся поправочный коэффициент.
- Для близнецов без отклонений был задан нулевой показатель пораженной фракции каждого образца.

Для близнецов, пораженных трисомией по 18 или 13 хромосоме, был уменьшен показатель фетальной фракции, соответствующий пораженной фракции образца. Уменьшение было пропорционально среднему уменьшению показателя фетальной фракции, наблюдавшемуся в клинических данных при трисомии по хромосоме 18 или 13 по отношению к euploidной одноплодной беременности.

И полная фетальная фракция, и пораженная фракция каждого смоделированного образца использовались для расчета показателя анеуплоидии с применением стандартного алгоритма системы VeriSeq™ NIPT Solution v2. Чувствительность рассчитывали путем определения того, как часто значения анеуплоидии для имитированных пораженных близнецов были выше соответствующего порога анеуплоидии. Соответственно, специфичность рассчитывали, определяя, как часто показатели анеуплоидии у симулированных незатронутых близнецов были ниже соответствующего порога анеуплоидии (таблица 39). 95% доверительные интервалы оценивались на основе числа реальных клинических образцов двуплодной беременности в наборе исходных данных, которые попадали под категорию пораженных или не пораженных соответствующей трисомией.

Для оценки чувствительности выявления Y-хромосомы в образцах двоен были смоделированы наборы XY/XY и XX/XY для двуплодной беременности. Было взято средневзвешенное значение (1 XY/XY:1 XX/XY), отображающее их распространенность в

популяции, для которой предполагалось применение. Для оценки специфичности Y-хромосомы в случае двойни был смоделирован набор XX/XX для двуплодной беременности. Общие значения фетальной фракции были смоделированы согласно известному распределению фетальной фракции в клинических образцах двуплодной беременности.

Для двуплодной беременности XY/XY и XX/XY была проведена оценка соответствующих показателей Y-хромосом с применением известного соотношения между фетальной фракцией и показателями Y-хромосомы в клинических образцах одноплодной беременности мужского пола. Только для двуплодной беременности XX/XY были смоделированы значения пораженной (т. е. мужского пола) фетальной фракции с использованием известного распределения отношений фетальных фракции, которые наблюдались между близнецами одной и той же беременности и были клинически определены как образцы разнополой двойни. Использовался консервативный подход, при котором выбиралась пораженная фракция, соответствующая меньшему из двух близнецов. Для каждого смоделированного образца XX/XY показатель Y-хромосомы умножался на значение пораженной фракции.

Для двуплодной беременности XX/XX показатели Y-хромосомы отбирались из показателей, которые наблюдались в клинических образцах одноплодной беременности женского пола. Показатель Y-хромосомы и общая фетальная фракция использовались для классификации каждого смоделированного образца относительно наличия или отсутствия Y-хромосомы с применением стандартного алгоритма системы VeriSeq™ NIPT Solution v2.

Расчет чувствительности проводился путем определения того, насколько часто смоделированные образцы двуплодной беременности XY/XY или XX/XY правильно классифицировались относительно наличия Y-хромосомы. Расчет специфичности проводился путем определения того, насколько часто смоделированные образцы двуплодной беременности XX/XX правильно классифицировались относительно отсутствия Y-хромосомы. 95% доверительные интервалы оценивались на основе числа реальных клинических образцов двуплодной беременности в наборе исходных данных, которые классифицировались относительно наличия или отсутствия Y-хромосомы.

Таблица 41. Оценка трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам в смоделированных группах двуплодной беременности

	Трисомия по 21 хромосоме	Трисомия по 18 хромосоме	Трисомия по 13 хромосоме	Наличие Y-хромосомы
Чувствительность	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
2-сторонний 95% ДИ	(86,4%; 98,9%)	(68,3%; 99,4%)	(64,1%; 98,9%)	(99,9%; > 99,9%)
Специфичность	99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%
2-сторонний 95% ДИ	(99,8%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,7%; > 99,9%)

В таблице 41 указаны расчетные показатели и предполагаемые 95% доверительные интервалы для чувствительности и специфичности системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 при выявлении трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам и наличия Y-хромосомы в смоделированной группе двуплодной беременности, соответствующей популяции

предполагаемого применения. Оценка доверительных интервалов проводилась на основе числа клинических образцов двуплодной беременности, прошедших КК и попавших в категорию образцов, которые поражены или не поражены соответствующей трисомией. Расчет чувствительности предполагает, что две трети пораженных образцов двуплодной беременности относятся к дизиготным с одним пораженным плодом, а оставшаяся треть — к монозиготным с двумя пораженными плодами.

Приведенная в таблице 41 оценка относится только к двуплодным беременностям. Вследствие низкой распространенности многоплодной беременности с более высоким количеством плодов (три плода и более) данных для создания соответствующих статистических моделей оценки точности выявления анеуплоидии было недостаточно.

Аналитические характеристики

Воспроизводимость

Для оценки и количественного определения воспроизводимости теста, с помощью программного обеспечения VeriSeq™ v2 (VeriSeq™ Assay Software v2) был проведен повторный анализ данных из двух предыдущих исследований, полученных с использованием системы VeriSeq™ NIPT Solution:

- ▶ Исследование воспроизводимости на нескольких лабораторных площадках, включавшее 3 запуска, которые проводили 3 оператора на 3-х лабораторных площадках, используя одну и ту же партию реагентов суммарно для 9 запусков.
- ▶ Внутрिलाбораторное изучение воспроизводимости результатов, включавшее 12 запусков в одном центре, которые проводились с использованием двух станций дозирующих автоматических VeriSeq NIPT Microlab STAR, двух систем секвенирования и трех партий реагентов.

Целью исследования воспроизводимости было количественное определение точности анализа в отношении трисомии 21 (T21) и хромосомы Y и оценка вариабельности между различными инструментами, комплектами для подготовки библиотек и партиями реагентов для секвенирования.

Был получен пул ДНК с 5% долей ДНК плода с трисомией по 21 хромосоме, для чего объединили сцДНК из плазмы беременных (с плодом, имеющим трисомию по 21 хромосоме) и сцДНК из плазмы не беременных женщин. Также был создан пул сцДНК для 10% фетальной фракции плода мужского пола (плод XY). Панель образцов каждого исследования и каждого запуска включала в себя 4 реплики из пула образцов, пораженных T21, с 5% фетальной фракции и 20 реплик из пула сцДНК с 10% фетальной фракцией плода мужского пола. Анализ проводили в течение 10 дней (в общей сложности 21 запуск для 2 исследований в совокупности).

Для определения качества, основанного на репрезентативности клинических условий и сложности выявления отклонений, были выбраны T21 и обнаружение Y-хромосомы. Хотя 21 хромосома является второй из самых маленьких аутосом человека, ее размер непосредственно влияет на чувствительность выявления T21, особенно при низких значениях фетальной фракции, таких как в данном исследовании. Y-хромосома, присутствующая в плазме беременной женщины, является исключительно плодной по своему происхождению, и поэтому ее легче обнаружить во время анализа.

Наблюдаемое среднее и стандартное отклонения показателя LLR для 21 хромосомы и нормализованных хромосомных значений (NCV) для Y-хромосомы показали, что

стандартное отклонение (SD) реплики являлось наибольшим источником изменчивости. Разница между лабораторными площадками, приборами и партиями реагентов добавили незначительную вариабельность, о чем свидетельствует разница между общим SD и SD реплики указанным в таблице 42 и таблице 43.

Таблица 42. Сводные данные стандартного отклонения (SD) воспроизводимости результата секвенирования на нескольких лабораторных площадках

Реакция	N	Среднее	SD реплики	Общее SD воспроизводимости*
Показатель LLR для 21 хромосомы	36	34,43	11,36	11,36
NCV Y-хромосомы	180	190,56	7,96	10,20

* Общее значение включает изменчивость, связанную с центром, оператором, анализом, днем и репликой.

Таблица 43. Сводные данные внутрилабораторной воспроизводимости результата секвенирования

Реакция	N	Среднее	SD реплики	Общее SD по лаборатории*
Показатель LLR для 21 хромосомы	48	36,01	9,07	10,25
NCV Y-хромосомы	240	198,68	7,63	7,82

* Общее значение включает изменчивость, связанную с прибором для секвенирования, партией реагентов, оператором, анализом, днем и репликой.

Было проведено дополнительное исследование для сравнения воспроизводимости секвенирования системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 (общее стандартное отклонение) с использованием проточной ячейки версии 2.0 в сравнении с версией 2.5. Во время исследования использовалось два типа проточных ячеек (версий 2.0 и 2.5), три партии наборов для секвенирования, четыре прибора, на которых проведено по два запуска секвенирования для каждой комбинации, что в итоге дало 48 запусков для одной лабораторной площадки. Один пул секвенирования был подготовлен с использованием планшетов сцДНК, подготовленных вручную. Панель образцов включает в себя 4 реплики из пула образцов с T21, с 5% фетальной фракции и 20 реплик из пула сцДНК с 10% фетальной фракции плода мужского пола (плод XY). Результаты исследования представлены в таблице 44 и свидетельствуют об отсутствии разницы между точностью секвенирования при использовании проточных ячеек версии 2.0 и версии 2.5.

Таблица 44. Сводные данные по воспроизводимости реакции секвенирования при использовании проточных ячеек версии 2.0 и версии 2.5

Реакция	Кол-во наблюдений для версии	Общий SD в. 2.0*	Общий SD в. 2.5*	Статистический результат**
21 Хромосома	96	9,56	8,44	Статистически эквивалентный (значение p=0,25)
Показатель LLR				
NCV Y-хромосомы	480	7,74	7,38	Статистически эквивалентный (значение p=0,38)

* Общее значение включает изменчивость, связанную с прибором для секвенирования, партией реагентов, анализом, днем и повтором.

** На основе F-критерия для дисперсионного равенства (стандартные отклонения в квадрате)

Перекрестная контаминация

Перекрестную контаминацию оценивали в процессе подготовки образцов для системы VeriSeq™ NIPT Solution v2. Пулы плазмы, взятой у не беременных женщин (XX) и взрослых мужчин (XY), анализировали в шахматном порядке в планшетах на 96 лунок в 4 планшетах. N=48 для образцов плазмы женщин и мужчин в каждом планшете; в общей сложности 192 женских и 192 мужских образца. Ни в одном из женских образцов не было данных о наличии Y хромосомы, статистически значимо превышавших фон определения, что говорит об отсутствии перекрестной контаминации от мужских образцов в том же планшете. В системе VeriSeq™ NIPT Solution v2 не наблюдалось детектируемой перекрестной контаминации.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки влияния интерферирующих веществ на работу системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 характеристики системы оценивали в присутствии потенциально интерферирующих веществ.

В пулы материнской плазмы, взятой у беременных с плодами женского пола (XX) без отклонений, по отдельности добавляли альбумин, билирубин, гемоглобин и триглицериды (эндогенные) в двух концентрациях для каждого анализируемого вещества (n = 16 в каждом случае). Влияния этих веществ на характеристики анализа выявлено не было.

Таблица 45. Потенциальные интерферирующие вещества (эндогенные)

Исследуемое	Низкая концентрация (мг/мл)	Высокая концентрация (мг/мл)
Альбумин	35	50
Билирубин	0,01	0,15
Гемоглобин	100	200
Триглицерид	1,5	5

Естественным образом присутствующая в плазме материнская геномная ДНК тоже потенциально может влиять на проведение анализа, поскольку может быть выделена вместе с сцДНК плода. Геномную ДНК в количестве 1,6; 3,3 и 4,9 нг на образец (что соответствует превышению средней ожидаемой концентрации геномной ДНК после 7 дней хранения на 1, 2 и 3 стандартных отклонения¹²) добавляли к сцДНК, выделенной из материнской плазмы беременных с плодами женского пола (XX) без отклонений. После этого образцы анализировали системой VeriSeq™ NIPT Solution v2 (n=16 для каждой концентрации). В присутствии повышенного уровня геномной ДНК изменений в характеристиках анализа выявлено не было.

В соответствии с EP7-A2 (Оценка мешающих влияний в клинической химии; одобренное руководство - второе издание) была проведена оценка двадцати потенциальных интерферирующих веществ (экзогенных), часто используемых или назначаемых во время беременности. Двадцать потенциальных интерферирующих веществ были объединены в 4 пула, затем внесены в материнскую плазму, полученную у беременных с плодами женского пола (XX) без отклонений, и проанализированы в системе VeriSeq™ NIPT Solution v2 (N=16 для каждого пула).

Изменений в характеристиках анализа в присутствии этих экзогенных веществ выявлено не было.

Таблица 46. Потенциальные интерферирующие вещества (экзогенные)

Пул 1	Пул 2	Пул 3	Пул 4
Парацетамол	Дифенгидрамин	Альбутерол	Цетиризин
Ацетилцистеин	Эритромицин	Бупропион	Декстрометорфан
Бисопролол	Гвайфенезин	Кофеин	Аскорбиновая кислота
Циталопрам	Гепарин	Сертралин	Метопролол
Дезлоратадин	Лидокаин	Натрия фторид	Надолол

Предел обнаружения

Предел обнаружения (LOD) определяется как уровень фетальной фракции, который соответствует 95% вероятности обнаружения интересующего состояния, как, например, T21. Чтобы оценить предел обнаружения системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 для различных широко распространенных состояний, были проведены исследования и статистический анализ.

Вероятность обнаружения интересующего состояния в пораженном образце, обработанном с помощью, системы VeriSeq™ NIPT Solution v2 главным образом зависит от трех факторов:

- ▶ фетальной фракции;
- ▶ глубины секвенирования;
- ▶ размера и сложности интересующей геномной области.

При условии постоянной глубины секвенирования заданную аберрацию легче обнаружить в образце с более высоким процентным отношением фетальной фракции, чем в образце с более низким. И наоборот, при условии постоянной фетальной фракции заданную аберрацию легче обнаружить в образце с большей глубиной секвенирования, чем в образце с меньшей глубиной секвенирования. И наконец, аберрации в более мелких или более сложных геномных областях обнаружить тяжелее, чем в более крупных или менее сложных геномных областях, но при этом фетальная фракция и глубина секвенирования должны быть постоянными.

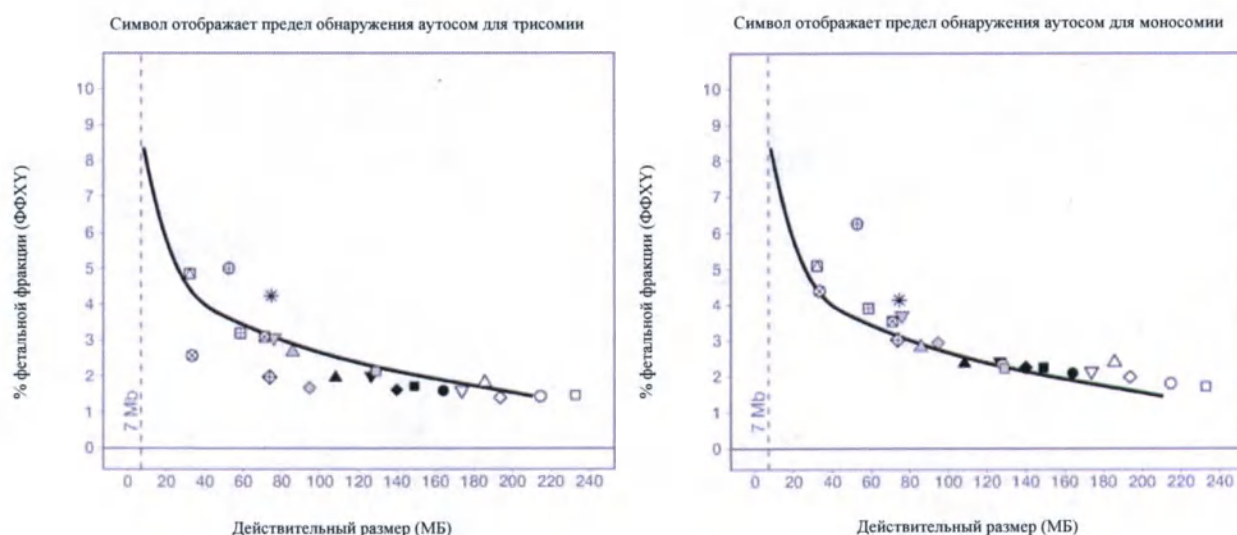
Чтобы определить предел обнаружения T21, был проведен анализ образцов, содержащих смеси объединенных образцов с T21 и образцов без отклонений. Для создания ряда из семи уровней фетальной фракции (0, 2, 3, 4, 5, 6 и 10%) путем титрования было смешано два типа анализируемых веществ. Каждый уровень был представлен в общей сложности 10 репликами.

Чтобы увеличить разрешающую способность модулятора фетальной фракции для анализа предела обнаружения, данные этого исследования были дополнены данными, полученными путем разбавления *in silico*. Результаты экспериментального разбавления и титрования были смоделированы путем контролируемого смешивания данных секвенирования. Данные этого *in silico* титрования охватывали 14 уровней фетальной фракции (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 и 4,50%) с 32 репликами для каждого уровня. К полученным данным был применен пробит-анализ с целью определения предела обнаружения для T21. Независимо от этого, была разработана статистическая модель, в которой использовалась фетальная фракция, глубина секвенирования и размер/сложность геномной области, предназначенная для прогнозирования вероятности обнаружения любых аберраций в образцах. Эта модель была создана с использованием

данных, соответствующих набору из 1405 образцов ХУ. Предел обнаружения для T21, прогнозируемый этой моделью, оказался соответствующим оценке на основе вышеописанного пробит-анализа. Данная статистическая модель использовалась для оценки значений предела обнаружения для анеуплоидии во всех аутосомах, а также для частичных делеций и дупликаций.

На рисунке 17 указана 95% вероятность обнаружения для средних областей по размеру и пределы обнаружения аутосом для всех видов трисомии и моносомии.

Рисунок 17. 95% вероятность обнаружения для средних областей по размеру для системы VeriSeq™ NIPT Solution v2



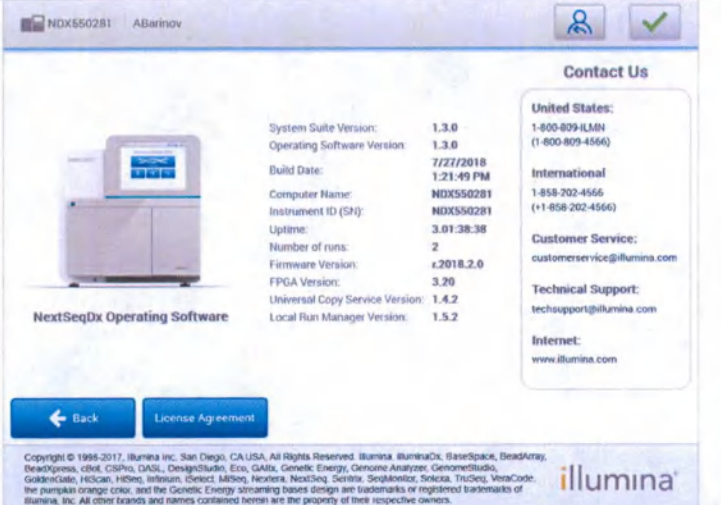
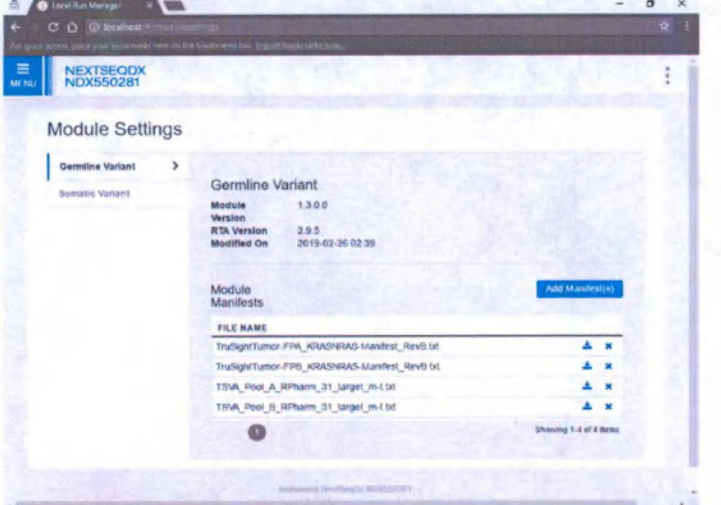
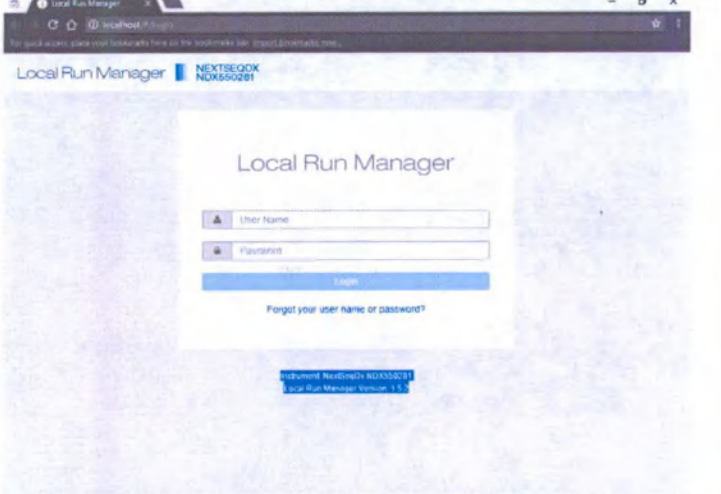
Хр.	Символ	Трисомия		Моносомия	
		Предел LLR	LoD (%)	Предел LLR	LoD (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
~6~	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	⊙	12,2	2,14	15,7	2,35

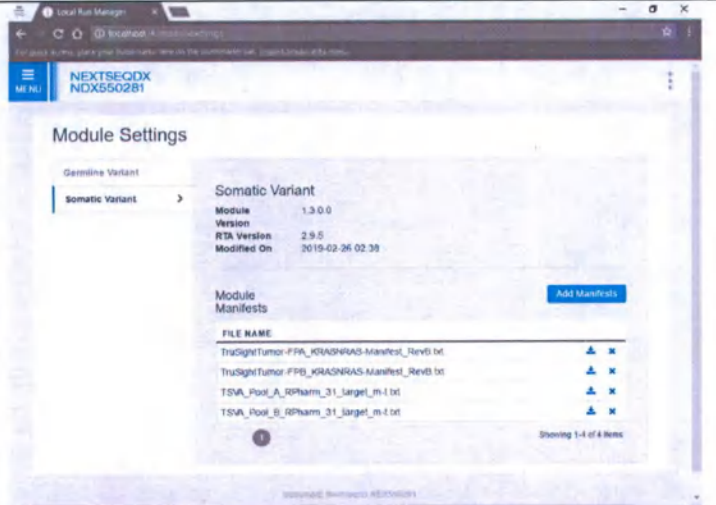
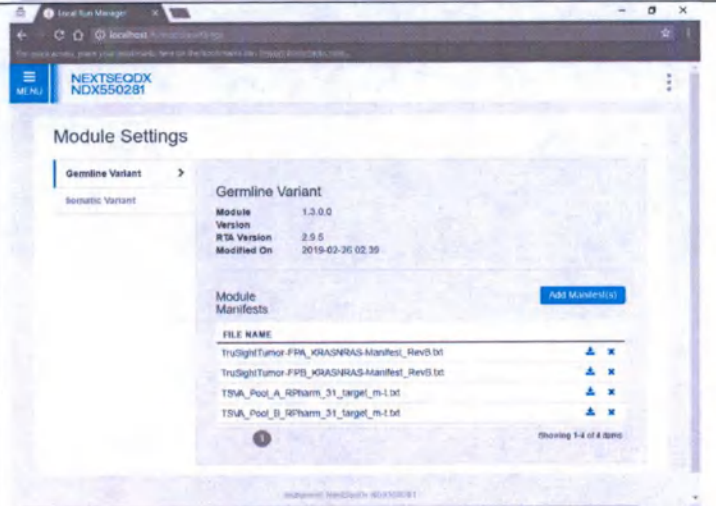
Хр.	Символ	Трисомия		Моносомия	
		Предел LLR	LoD (%)	Предел LLR	LoD (%)
12	⊠	11,6	2,14	12,8	2,22
13	◇	3	1,68	16,5	2,94
14	△	12,7	2,68	14,7	2,82
15	▽	9,8	3,07	16,4	3,69
16	⊠	10,7	3,10	15,3	3,54
17	⊠	16,8	4,25	15,7	4,14
18	⊠	3	1,98	11,3	3,02
19	⊠	15,5	5,01	27,5	6,26
20	⊠	10,6	3,20	18,2	3,91
21	⊠	2,5	2,58	13,2	4,40
22	⊠	13,5	4,87	15,3	5,09

11. Сведения о программном обеспечении

Общие сведения о программном обеспечении секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Описанное в этой главе программное обеспечение используется для конфигурирования, генерирования и анализа данных секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx. Программное обеспечение прибора включает в себя интегрированные приложения, которые выполняют анализ прогона секвенирования. Обновления программного обеспечения выполняют сотрудники компании «Иллюмина».

Программное обеспечение	Функция	Описание
Системное программное обеспечение NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Контролирует работу прибора	Приложение NOS управляет работой прибора во время секвенирования и генерирует изображения для использования программным обеспечением анализа в реальном времени (RTA).
Программное обеспечение для анализа в режиме реального времени (RTA)	Выполняет первичный анализ	Приложение RTA преобразует изображения, сгенерированные NOS для каждого перекрытия за цикл секвенирования, в файлы распознавания оснований, которые являются входными данными для модулей анализа для Local Run Manager. Приложение RTA не имеет пользовательского интерфейса.
Локальный менеджер прогона Local Run Manager	Интерфейс для выбора модуля	Локальный менеджер прогона Local Run Manager - это включенная в прибор программа для пользовательского управления, выбора соответствующего модуля анализа и контроля статуса.
Модуль для соматических вариантов	Выполняет вторичный анализ	Программное обеспечение модуля анализа Local Run Manager - распознает основания при вторичном анализе. Обработка данных включает в себя демультиплексирование, генерирование файла FASTQ, выравнивание, распознавание вариантов и создание отчетов. Программное обеспечение для распознавания вариантов (Piscis) генерирует файлы VCF, которые содержат информацию о вариантах, обнаруженных в конкретных позициях по отношению к референтному геному, и включают в себя измеренную частоту вариантов.
Модуль для герминальных вариантов	Выполняет вторичный анализ	Программное обеспечение модуля анализа Local Run Manager - распознает основания при вторичном анализе. Обработка данных включает в себя демультиплексирование, генерирование файла FASTQ, выравнивание, распознавание вариантов и создание отчетов. Программное обеспечение для распознавания вариантов (Piscis) генерирует файлы VCF, которые содержат информацию о вариантах, обнаруженных в конкретных позициях по отношению к референтному геному, и идентифицирует каждый вариант как гетерозиготный или гомозиготный.
Программное	Версия	Изображение

Системное программное обеспечение NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	1.3.0 от 23.07.2018 и выше	
Программное обеспечение для анализа в режиме реального времени (RTA)	2.9.5 от 22.09.2017 и выше	
Локальный менеджер прогона Local Run Manager	1.5.2 от 03.08.2018 и выше	

Модуль для соматических вариантов	1.3.0 от 31.01.2019 и выше	
Модуль для герминальных вариантов	1.3.0 от 31.01.2019 и выше	

Более подробная информация приведена в Руководстве справочном для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS).

12. Калибровка

Калибровка прибора проводится в следующих случаях:

1. В ходе инсталляции и контроля качества прибора.
2. 1 раз в год в качестве профилактического технического обслуживания прибора.
3. После любых процедур технологического обслуживания прибора.
4. После любого перемещения прибора.

Для калибровки прибора требуется специальное сервисное оборудование; калибровка выполняется квалифицированным персоналом компании «Иллюмина» (Illumina) (инженер по обслуживанию на местах).

13. Срок эксплуатации

Предполагается, что при условии ежегодного проведения профилактического обслуживания и ремонта срок эксплуатации прибора составит 10 лет.

14. Защита окружающей среды

При правильном применении, транспортировке и хранении данное медицинское изделие не представляет угрозы для окружающей среды.

15. Условия окружающей среды

Параметр	Значение
Температура	Транспортировка и хранение: от -10 до 50 °C (от 14 до 122 °F). Эксплуатация: Поддерживайте температуру в лаборатории от 19 до 25 °C (22 ± 3 °C). Это соответствует рабочей температуре прибора. Во время рабочего цикла не допускайте изменения окружающей температуры более чем на ±2 °C.
Влажность	Транспортировка и хранение: Относительная влажность без образования конденсата 15-80 %. Эксплуатация: Поддерживайте уровень относительной влажности без образования конденсата в пределах 20–80 %.
Высота над уровнем моря	Устанавливайте прибор на высотной отметке ниже 2000 метров (6500 футов).
Качество воздуха	Используйте прибор в условиях воздуха степени загрязнения II или чище. Воздух степени загрязнения II обычно содержит только непроводящие загрязняющие вещества.
Вентиляция	Проконсультируйтесь с соответствующим отделом вашей компании, чтобы выработать требования к вентиляции на основании характеристик тепловыделения прибора.
Вибрация	Ограничьте постоянную вибрацию пола лаборатории до уровня офиса ISO. Во время проведения секвенирования не превышайте пределы операционной комнаты ISO. Избегайте периодических ударов или возмущений вблизи прибора.

Тепловыделение

Измеренная мощность	Тепловая мощность
600 Вт	2048 БТЕ/час

Уровень шума

Уровень шума (дБ)	Расстояние до прибора
< 70 дБ	1 м (3,3 фута)

Измеренный уровень шума < 70 дБ соответствует уровню звука обычного разговора на расстоянии примерно 1 метр (3,3 фута).

16. Процедура утилизации или уничтожения медицинского изделия

Медицинское изделие следует утилизировать с соблюдением установленных лабораторных правил, а также местных и государственных регламентов.

Эксплуатация прибора связана с использованием реагентов, которые следует утилизировать как эпидемиологически опасные (класс Б) с соблюдением установленных лабораторных правил, а также местных и государственных регламентов.

17. Перечень применимых стандартов

Стандарт	Описание стандарта
IEC 61326-2-6	Оборудование электрическое для измерения, управления и лабораторного применения. Требования электромагнитной совместимости. Часть 2-6. Частные требования. Медицинское оборудование для диагностики в лабораторных условиях
EN 980	Медицинские приборы. Графические символы, используемые при маркировке медицинских устройств
IEC/EN 61010-1	Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Часть 1. Общие требования.
IEC/EN 61010-2-010	Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Часть 2-010. Частные требования к лабораторному оборудованию для нагревания материалов
IEC 61010-2-101	Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Часть 2-101. Частные требования к медицинскому оборудованию для лабораторной диагностики (IVD)
IEC/EN60825-1	Безопасность лазерной аппаратуры. Часть 1. Классификация и требования к аппаратуре.
EN 50364	Ограничение облучения человека электромагнитными полями от устройств, работающих в диапазоне частот 0 - 300 ГГц, указанных в Обзоре электронных изделий, Идентификация радиочастот и подобных документов
EN 62304	Программные средства медицинского оборудования. Жизненный цикл программного продукта.
EN ISO 13485	Изделия медицинские. Системы управления качеством. Требования к регулированию
EN ISO 14971	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN ISO 15223-1	Устройства медицинские. Символы, используемые на ярлыках медицинских устройств при маркировке в представленной информации. Часть 1
EN 301 489-1 v1.9.1	Электромагнитная совместимость и радиочастотный спектр. Электромагнитная совместимость технических средств радиосвязи. Часть 1. Общие технические требования

18. Размещение и установка оборудования

• Требования к размещению

Установите прибор в место с нормальной вентиляцией, доступом к выключателю питания и розетке, а также с возможностью доступа для техобслуживания.

► Обеспечьте свободное пространство с левой стороны прибора для доступа к

тумблеру включения питания на задней панели.

- Расположите прибор так, чтобы у рабочего персонала был свободный доступ к розетке для возможности быстрого отсоединения кабеля питания.
- Обеспечьте доступ к прибору со всех сторон.

Доступ	Минимальное свободное пространство
По сторонам	Минимум 61 см (24 дюйма) с каждой стороны прибора.
Сзади	Минимум 10,2 см (4 дюйма) за прибором
Сверху	Минимум 61 см (24 дюйма) над прибором

- **Рекомендации по снижению уровня вибрации**

Выполните следующие указания, чтобы снизить вибрацию во время циклов секвенирования и обеспечить оптимальную работу прибора:

- установите прибор на устойчивый лабораторный стол
- не устанавливайте на стол другое оборудование, которое может создавать вибрации, например, шейкер, вортекс, центрифуга, или приборы с мощными вентиляторами;
- не кладите никакие предметы сверху на прибор;
- во время цикла секвенирования не открывайте дверь отсека с реагентами, дверь отсека буферного раствора, правую технологическую панель или дверь отсека с проточными ячейками.

- **Подключение к электропитанию**

Учреждение должно быть оснащено следующим электрооборудованием:

Для сети 100–120 В перем. тока — заземленная, выделенная линия на 15 А с соответствующим напряжением и электрическим заземлением. Северная Америка и Япония — розетка: NEMA 5-15.

Для сети 220–240 В перем. тока — заземленная линия на 10 А с соответствующим напряжением и электрическим заземлением. Если колебания напряжения достигают более 10 %, требуется стабилизатор напряжения.

- **Заземление**

Прибор оборудован выходом для защитного заземления через корпус. Заземление кабеля питания обеспечивает надлежащий уровень электробезопасности. Во время использования устройства заземление кабеля питания должно функционировать должным образом.

Защитное заземление



На приборе предусмотрено подключение к системе защитного заземления через корпус. Провод предохранительного заземления в кабеле питания соединяется с точкой защитного заземления на корпусе прибора. Во время эксплуатации устройства соединение защитного заземления через кабель питания должно быть в нормальном рабочем состоянии.

Предохранители

В приборе отсутствуют предохранители, которые могут быть заменены пользователем.

Шнур питания используется для отключения устройства от сети переменного тока.

На задней панели прибора есть выключатель питания, который отключает постоянное

напряжение от прибора и он имеет соответствующую маркировку (положение «Вкл» ).



За безопасность любой системы, входящей в состав оборудования, несет ответственность, монтирующий систему.

19. Требования к техническому обслуживанию и ремонту медицинского оборудования
Процедуры технического обслуживания включают промывание прибора вручную и замену воздушного фильтра как описано в Руководстве справочном для секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx.

Промывания прибора — Автоматическое промывание после прогона после каждого прогона секвенирования поддерживает функциональные характеристики прибора. Тем не менее, в определенных условиях периодически требуется промывание, выполняемое вручную.

Замена воздушного фильтра — Регулярная замена воздушного фильтра обеспечивает надлежащий поток воздуха через прибор.

Кроме того, описаны процедуры выключения и перезагрузки прибора.

Профилактическое обслуживание

Компания Иллюмина (Illumina) рекомендует запланировать ежегодное проведение профилактического технического обслуживания. Если у вас нет контракта на обслуживание, свяжитесь с территориальным специалистом по работе с клиентами или со службой технической поддержки компании Иллюмина (Illumina) и организуйте платное профилактическое техническое обслуживание.

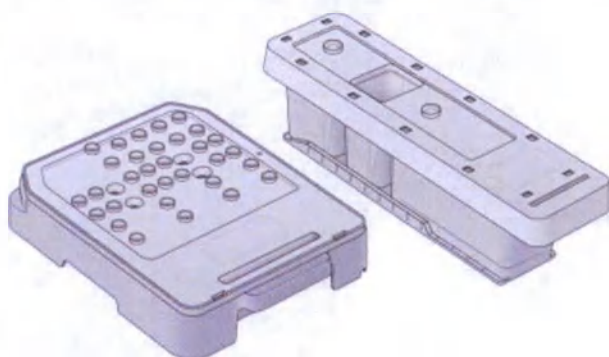
Выполнение промывки вручную

Промывание вручную запускается на главном экране. Варианты промывания включают быстрое промывание и промывание вручную после прогона.

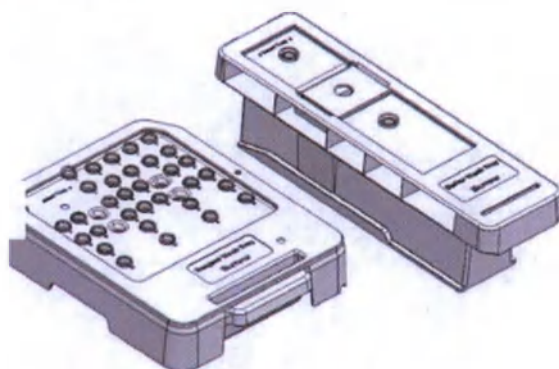
Типы промывания	Описание
Длительность быстрого промывания: 20 минут	Промывание системы подаваемым пользователем промывочным раствором лабораторной воды и Tween 20 (Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)). Требуется каждые 14 суток простоя прибора с установленными картриджем с реагентами и картриджем с буфером. Требуется каждые 7 суток, если прибор находится в сухом состоянии (Лоток для
Длительность промывания вручную после прогона: 90 минут	Промывание системы подаваемым пользователем промывным раствором лабораторной воды и Tween 20 (Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) и 0,12% раствором гипохлорита натрия (Лоток для промывки (Reagent Wash Tray)). Требуется, если автоматическое промывание после прогона не выполнялось.

Для промывания вручную требуется Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray), поставляемые с прибором, и использованная проточная ячейка. Исползованная проточная ячейка может применяться для промывания прибора до 20 раз.

Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)



Новый лоток для промывки (Reagent Wash Tray) и лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)



Подготовка к промывке прибора вручную после прогона

Выберите подготовку к промыванию вручную после прогона, как описано ниже, или приготовьтесь к быстрому промыванию (следующий раздел). Если вы собираетесь выполнить промывание вручную после прогона, пропустите раздел быстрого промывания и начните с *загрузки использованной проточной ячейки и лотков для промывания* в справочном руководстве или ниже раздел **«Загрузка использованной проточной ячейки и картриджей для промывки»**

Поставляемые пользователем расходные материалы	Объем и описание
NaOCl	1 мл, разведенный до 0,12% Заливается в Лоток для промывки (Reagent Wash Tray) (положение №28)
100 % Tween 20	Используется для приготовления 125 мл промывочного раствора Tween 20
Вода лабораторного класса чистоты	0,05% Заливается в Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) (центральная емкость)

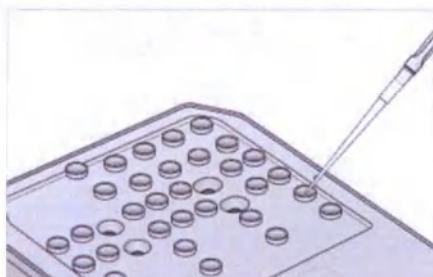
ПРИМЕЧАНИЕ: Всегда используйте свежее разведение NaOCl, приготовленное в последние 24 часа. Если вы приготовили объем более 1 мл, храните оставшееся разведение при 2°C - 8°C для использования в течение следующих 24 часов. Иначе утилизируйте оставшееся разведение NaOCl.

1. Залейте следующие объемы в микроцентрифужную пробирку для приготовления 1 мл

0,12% NaOCl:

- ▶ 5% NaOCl (24 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (976 мкл)
2. Переверните пробирку для перемешивания.
 3. Добавьте 1 мл 0,12% NaOCl в лоток для промывки реагента. Нужная емкость соответствует положению №28 заполненного лотка.

Заполнение NaOCl



4. Смешайте следующие объемы для приготовления 0,05% промывочного раствора Tween 20:

Оригинальный лоток для промывочного реагента (Reagent Wash Tray)

- ▶ 100% Tween 20 (62 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (125 мл)
 - ▶ Добавьте 125 мл промывочного раствора в центральную емкость лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)
- Новый лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)
- ▶ 100% Tween 20 (75 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (150 мл)
 - ▶ Добавьте 150 мл промывочного раствора в центральную емкость лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray)

Подготовка к быстрому промыванию

В качестве альтернативы *Подготовка к промывке прибора вручную после прогона см. выше раздел «Подготовка к промывке прибора вручную после прогона»* или в справочном руководстве можно выбрать подготовки к быстрой промывке.

Поставляемые пользователем

Объем и описание

расходные материалы

100% Tween 20	Используется для приготовления 40 мл промывочного раствора Tween 20
Вода лабораторного класса чистоты	0,05% Заливается в Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) (центральная емкость)

1. Смешайте следующие объемы для приготовления 0,05% промывочного раствора Tween 20:
 - ▶ 100% Tween 20 (20 мкл)
 - ▶ Вода лабораторного класса чистоты (40 мл)
2. Добавьте 40 мл промывочного раствора в центральную емкость Лотка для промывочного буфера (Buffer Wash Tray).
3. Выберите «**Perform Wash**» (выполнить промывание) и затем выберите «**Quick Wash**» (быстрое промывание)

Загрузка использованной проточной ячейки и лотков для промывания

1. Если использованная проточная ячейка не установлена, загрузите использованную проточную ячейку. Выберите «**Load**» (загрузка), и затем «**Next**» (далее).
2. Извлеките контейнер с израсходованными реагентами и утилизируйте его содержимое в соответствии с применимыми стандартами.

Примечание: Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может возникнуть при вдыхании, употреблении внутрь, контакте с кожей и контакте с глазами. Надевайте средства индивидуальной защиты, включая защиту глаз, перчатки и лабораторный халат, в соответствии с риском контакта. Обращайтесь с использованными реагентами как с химическими отходами и утилизируйте их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и требованиями. Дополнительная информация по окружающей среде, здоровью и безопасности приводится в паспорте безопасности по ссылке support.illumina.com/sds.html.

1. Задвиньте пустой контейнер для израсходованных реагентов в отсек для буфера до упора.
2. Извлеките использованный буферный картридж предыдущего прогона, если он установлен.
3. Загрузите Лоток для промывочного буфера (Buffer Wash Tray) с раствором для промывания.
4. Извлеките использованный картридж с реагентами предыдущего прогона, если он установлен.
5. Загрузите Лоток для промывки (Reagent Wash Tray).
6. Выберите «**Next**» (далее). Проверка перед промыванием начинается автоматически.

Запустите промывание

1. Выберите «**Start**» (запуск).
2. После завершения промывания выберите «**Home**» (главная).

После промывания

После промывания системы подачи остаются в нижнем положении, чтобы не допустить попадания воздуха в систему. Оставьте картриджи на месте до следующего прогона.

Замена фильтра воздушного

Фильтр воздушный обеспечивает поток воздуха через прибор. Программное обеспечение отображает уведомление о замене воздушного фильтра каждые 90 суток. При появлении подсказки выберите «**Remind in 1 day**» (напомнить через 1 день), или выполните следующую процедуру и выберите «**Filter Changed**» (фильтр заменен). После выбора «**Filter Changed**» (фильтр заменен), отсчет 90 суток сбрасывается.

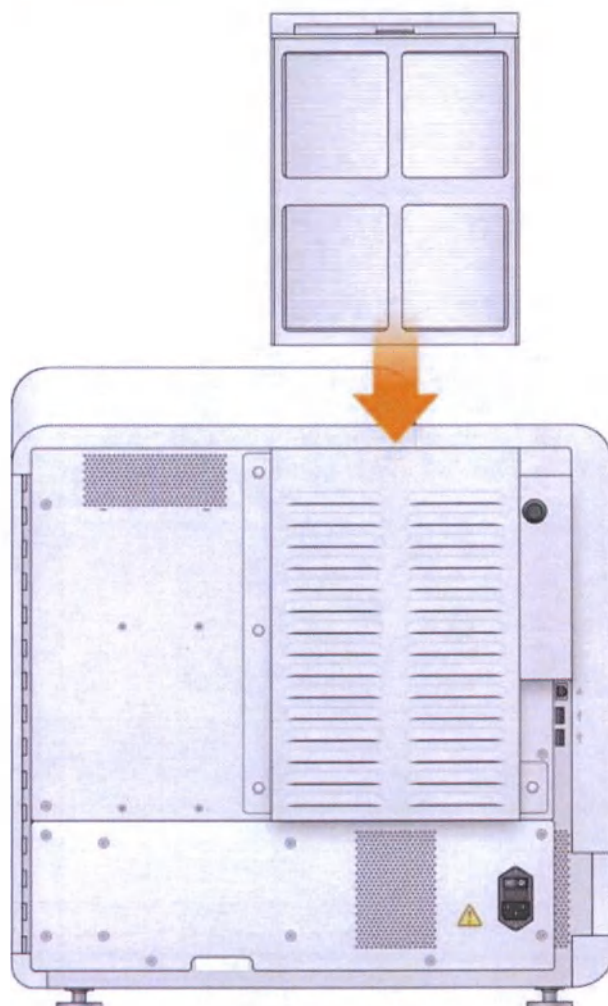
1. Извлеките новый воздушный фильтр из упаковки и запишите дату установки на корпусе фильтра.
2. На задней панели прибора нажмите вниз на верхнюю часть отсека фильтра для извлечения отсека.
3. Удерживайте верхнюю часть отсека фильтра и полностью вытяните отсек из прибора.
4. Извлеките и утилизируйте прежний воздушный фильтр.
5. Вставьте новый воздушный фильтр в отсек.

ПРИМЕЧАНИЕ: Воздушный фильтр будет работать неправильно, если установить его наоборот. Убедитесь, что воздушный фильтр вставлен в отсек таким образом, что видна зеленая стрелка вверх.

и не видна табличка с предупреждением. Стрелка должна указывать на рукоятку отсека фильтра.

6. Задвиньте отсек фильтра в прибор. Нажмите на верхнюю часть отсека фильтра и установите его до щелчка.

Рисунок 18. Установка воздушного фильтра



Ремонт

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx является полностью ремонтпригодным и в полной мере пригодным для обслуживания при эксплуатации на местах устройством. Все детали, подверженные износу и/или имеющие критическое значение для функционирования, могут быть заменены в полевых условиях. Следовательно, ни одно повреждение компонентов не приведет к прекращению эксплуатации устройства.

20. Гарантия производителя

Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие неприемлемого уровня риска причинения вреда жизни и здоровью человека, а также вреда окружающей среде при целевом использовании медицинского изделия в условиях, оговоренных производителем.

21. Рекламации

По всем вопросам, связанным с гарантийной ответственностью производителя, следует

обращаться к уполномоченному представителю производителя в России:

ООО Р-Фарм Интернешнл (R-Pharm International LLC)

Адрес: Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Тел: +7 (495) 956-79-37, Факс.: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

Перевод с английского языка на русский язык

/Большая печать штата Мэриленд/

Штат Мэриленд

Канцелярия секретаря штата

Настоящий апостиль недействителен для использования в Соединенных Штатах Америки, на территориях и во владениях, принадлежащих данному государству.
Настоящий апостиль не удостоверяет содержание документа, в отношении которого он выдан.

Apostille (Апостиль)

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961 (Гаагская конвенция от 5 октября 1961 г.))

1. Страна: Соединенные Штаты Америки
Настоящий официальный документ
2. Подписан Скоттом А. Пойером (Scott A. Poyer)
3. Выступающим в качестве секретаря Окружного суда
4. Скреплен печатью/штампом секретаря Окружного суда округа Анн-Арандел

Удостоверено

5. В г. Аннаполисе, штат Мэриленд
6. 22 сентября 2022 г.
7. Секретарем штата Мэриленд
8. За № 613659
9. Место печати:

/Печать/: ПЕЧАТЬ КАНЦЕЛЯРИИ
СЕКРЕТАРЯ ШТАТА * МЭРИЛЕНД

10. Подпись:

/Подпись/

Секретарь штата

Штат Мэриленд, округ Анн-Арандел

Я, СКОТТ А. ПОЙЕР, секретарь Окружного суда округа Анн-Арандел, штат Мэриленд, который является судом письменного производства, настоящим подтверждаю, что **Ахмад Миски** является должным образом назначенным, уполномоченным и квалифицированным нотариусом, действующим с 10 мая 2021 г.

В подтверждение вышесказанного я собственноручно подписал и скрепил печатью суда настоящий документ 22 сентября 2022 г.

/Подпись/

**Скотт А. Пойер, секретарь
Окружной суд округа Анн-Арандел, штат Мэриленд**

***/Печать/: ОКРУЖНОЙ СУД ОКРУГА АНН-АРАНДЕЛ * ШТАТ
МЭРИЛЕНД***

/Логотип/: «Иллюмина, Инк.»

Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS)

/Штамп/: Настоящим я, Ханади Аджамы, подтверждаю, что данный документ является оригиналом. *
/Подпись/ * Штат Мэриленд, округ Анн-Арандел * Подписано Ханади Аджамы под присягой в моем
присутствии. * Ахмад Миски * Нотариус /Подпись/ * 22 сентября 2022 г. * Срок действия полномочий
истекает 28 мая 2025 г.

/Печать/: ШТАТ МЭРИЛЕНД * ОКРУГ АНН-АРАНДЕЛ * НОТАРИУС * АХМАД МИСКИ

Дополнение к руководству по эксплуатации

Производитель:

«Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.)

Адрес:

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200
Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

/Штамп/: ЛИВАЙ П. ХОУП *
Нотариус, штат Калифорния *
Округ Сан-Диего *
Лицензия № 2377029 *
Срок действия полномочий
истекает 30 сентября 2025 года

От имени компании «Иллюмина, Инк.»

/Подпись/

Дата 22 сентября 2022 г.

Аурелия Браунридж (Aurelia
Brownridge),
старший специалист отдела по
вопросам нормативно-
правового регулирования
«Иллюмина, Инк.»

**ОФИЦИАЛЬНОЕ ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНИЕ
ШТАТА КАЛИФОРНИЯ**

§ 1189 ГРАЖДАНСКОГО КОДЕКСА

Нотариус или другое должностное лицо, заполнившее настоящее свидетельство, удостоверяет только личность лица, подписавшего документ, к которому приложено настоящее свидетельство, а не достоверность, правильность или действительность указанного документа.

Штат Калифорния
Округ САН-ДИЕГО

ко мне, ЛИБАЮ П. ХОУПУ, НОТАРИУСУ
Дата лично явилась УКАЗАТЬ ИМЯ, ФАМИЛИЮ И ДОЛЖНОСТЬ ОФИЦИАЛЬНОГО ЛИЦА
АУРЕЛИЯ БРАУНРИДЖ (AURELIA BROWNRIDGE)
Имя, фамилия лица, подписавшего документ

которая представила мне убедительные доказательства того, что она является лицом, чье имя указано в прилагаемом документе, и заверила меня, что имеет полномочия выступать в данном качестве и что путем проставления ее подписи в прилагаемом документе физическое или юридическое лицо, от имени которого она выступает, считается подписавшим такой документ.

Штамп: ЛИБАЙ П. ХОУП *
Нотариус, штат Калифорния *
Округ Сан-Диего *
Лицензия № 2377029 *
Срок действия полномочий истекает 30 сентября 2025 года

Будучи предупрежденным о НАКАЗАНИИ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ в соответствии с законами штата Калифорния, я удостоверяю, что информация в вышеприведенном разделе является правильной и точной.

ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНО моей подписью и официальной печатью.

Подпись: /Подпись/

Место печати и (или) штампа нотариуса

Подпись нотариуса

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Заполнение информации в данном разделе может предотвратить внесение изменений в документ или неправомерное присоединение данной формы к другому документу.

Описание приложенного документа

Название или тип документа: ДОПОЛНЕНИЕ К РУКОВОДСТВУ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ

Дата документа:

Количество страниц:

Подписавшие документ лица, не указанные выше:

Полномочия, заявленные лицами, подписавшими документ

Имя, фамилия лица, подписавшего документ:

☐ Должностное лицо компании, должность:

☐ Партнер: – ☐ с ☐ полный

ограниченной
ответственностью

☐ Физическое лицо ☐ Лицо, действующее по доверенности

☐ Доверительный управляющий ☐ Опекун или попечитель

☐ Другое:

Лицо, подписавшее документ, представляет:

Имя, фамилия лица, подписавшего документ:

☐ Должностное лицо компании, должность:

☐ Партнер: – ☐ с ☐ полный

ограниченной
ответственностью

☐ Физическое лицо ☐ Лицо, действующее по доверенности

☐ Доверительный управляющий ☐ Опекун или попечитель

☐ Другое:

Лицо, подписавшее документ, представляет:

©2019 г. Национальная ассоциация нотариусов

/Надпись на наклейке/: Россия. 208592

Перевод данного текста выполнен мной, переводчиком Тумановым Владимиром Олеговичем.



Российская Федерация

Город Москва

Семнадцатого октября две тысячи двадцать второго года.

Я, Якубова Татьяна Олеговна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Туманова Владимира Олеговича.

Подпись сделана в моем присутствии.

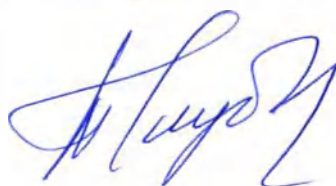
Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2171-н/77-2022- 51-1006

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 107 лист(а)(ов)

Нотариус



Т.О. Якубова

