

Modo de investigação do NextSeq 550Dx

Manual de referência do instrumento



Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produtos descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produtos aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produtos.

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LER INTEGRALMENTE E SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NOS PRODUTOS, LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AOS PRODUTOS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2018 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Histórico de revisão

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000041922 v01	Março de 2018	Adição de informações sobre o serviço de monitorização proativa da Illumina na secção Personalizar as definições do sistema.
Documento n.º 1000000041922 v00	Novembro de 2017	Edição inicial.

Índice

Capítulo 1 Descrição geral	1
Acerca deste manual	1
Introdução	1
Recursos adicionais	2
Componentes do instrumento	3
Descrição geral dos consumíveis de sequenciação	6
Capítulo 2 Introdução	11
Ligar o instrumento	11
Personalizar as definições do sistema	12
Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador	13
Capítulo 3 Sequenciação	15
Introdução	15
Fluxo de trabalho de sequenciação	16
Preparar o cartucho de reagentes	16
Preparar a célula de fluxo	17
Preparar bibliotecas para sequenciação	17
Configurar um ensaio de sequenciação	18
Monitorizar o progresso do ensaio	25
Lavagem automática pós-ensaio	27
Capítulo 4 Digitalização	29
Introdução	29
Fluxo de trabalho da digitalização	30
Transferir a pasta DMAP	30
Carregar o BeadChip no adaptador	31
Configurar uma digitalização	32
Monitorizar o progresso da digitalização	34
Capítulo 5 Manutenção	37
Introdução	37
Realizar uma lavagem manual	37
Substituir o filtro de ar	40
Atualizações de software	41
Opções de reinicialização e encerramento	43
Anexo A Resolução de problemas	45
Introdução	45
Ficheiros de resolução de problemas	45
Resolver erros de verificação automática	46
O recipiente de reagentes gastos está cheio	48
Fluxo de trabalho de rehibridação	49

Erros na digitalização e no BeadChip	51
Receitas personalizadas e pastas de receitas	52
Mensagem de erro RAID	52
Configurar as definições do sistema	53
Anexo B Real-Time Analysis	57
Descrição geral do Real-Time Analysis	57
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	58
Anexo C Ficheiros e pastas de saída	63
Ficheiros de saída da sequenciação	63
Estrutura de pastas de saída de sequenciação	66
Ficheiros de saída da digitalização	67
Estrutura de pastas de saída de digitalização	67
Índice remissivo	69
Assistência técnica	73

Capítulo 1 Descrição geral

Acerca deste manual	1
Introdução	1
Recursos adicionais	2
Componentes do instrumento	3
Descrição geral dos consumíveis de sequenciação	6

Acerca deste manual

Este manual de referência do instrumento fornece instruções sobre a utilização do instrumento NextSeq 550Dx no modo de investigação (RUO).

Introdução

O instrumento NextSeq™ 550Dx da Illumina® é uma solução única que permite uma transição simples entre a sequenciação de elevada produtividade e a digitalização em conjunto.

Funcionalidades de sequenciação

- ▶ **Sequenciação de elevada produtividade** — O instrumento NextSeq™ 550 permite a sequenciação de exomas, genomas completos e transcriptomas e suporta bibliotecas TruSeq™ e Nextera™.
- ▶ **Tipos de células de fluxo** — As células de fluxo estão disponíveis em configurações para saída elevada e saída intermédia. Cada tipo de célula de fluxo é agrupado em kits com um cartucho de reagentes previamente cheio compatível.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** — O software de análise integrado efetua a análise dos dados no instrumento, que inclui a análise de imagens e a identificação de bases. O NextSeq 550Dx utiliza uma implementação do RTA designado RTA v2, que inclui importantes diferenças na arquitetura e funcionalidades. Para obter mais informações, consulte a secção *Real-Time Analysis* na página 57.
- ▶ **Integração do BaseSpace®** — O fluxo de trabalho de sequenciação está integrado com o BaseSpace, o ambiente de computação de genoma da Illumina para a análise, armazenamento e colaboração de dados. Para os instrumentos configurados para o BaseSpace, as informações da biblioteca e os parâmetros do ensaio são especificados no separador Prep (Preparação) do BaseSpace. Os ensaios que foram configurados no BaseSpace são apresentados na interface do instrumento durante a configuração do ensaio. À medida que o ensaio avança, os ficheiros de saída são transmitidos em tempo real para o BaseSpace ou BaseSpace Onsite.

Funcionalidades de digitalização em conjunto

- ▶ **Digitalização em conjunto integrada no software de controlo** — O instrumento NextSeq 550Dx permite-lhe efetuar a transição entre a digitalização em conjunto e a sequenciação de elevada produtividade no mesmo instrumento utilizando o mesmo software de controlo.
- ▶ **Capacidade de aquisição de imagens alargada** — O sistema de aquisição de imagens no instrumento NextSeq 550Dx inclui software e modificações de estrado que permitem a aquisição de imagens de uma área superficial superior para acomodar a digitalização do BeadChip.
- ▶ **Tipos de BeadChip** — Os tipos de BeadChip compatíveis incluem CytoSNP-12, CytoSNP-850K e Karyomap-12.
- ▶ **Adaptador BeadChip** — Um adaptador BeadChip reutilizável permite o carregamento simples de um BeadChip no instrumento.
- ▶ **Análise de dados** — Utilize o software BlueFuse® Multi para analisar os dados em conjunto.

Recursos adicionais

A seguinte documentação está disponível para transferência no sítio Web da Illumina.

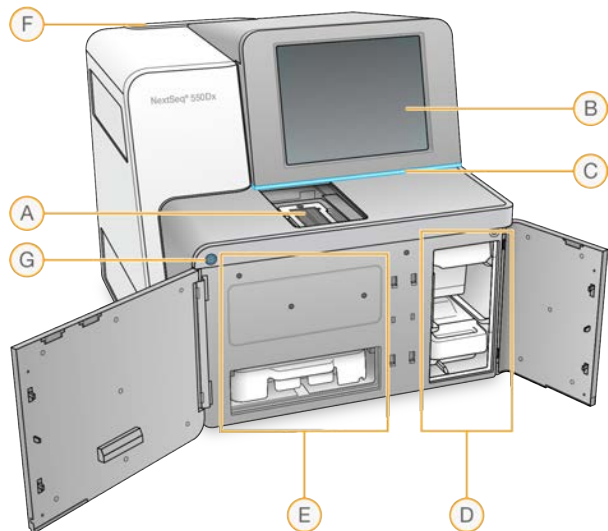
Recurso	Descrição
<i>Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)</i>	Quando se encontra no modo de diagnóstico, fornece instruções para utilizar o instrumento e os procedimentos de resolução de problemas.
<i>Manual de preparação do centro clínico do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009869)</i>	Fornecer as especificações para o espaço laboratorial, requisitos elétricos e considerações ambientais.
<i>Manual de segurança e conformidade do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009868)</i>	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e etiquetas do instrumento.
<i>Manual de conformidade do leitor RFID (documento n.º 1000000030332)</i>	Fornecer informações sobre o leitor RFID no instrumento, certificações de conformidade e considerações de segurança.
<i>Desnaturar e diluir bibliotecas para o sistema NextSeq (documento n.º 15048776)</i>	Fornecer instruções para efetuar a desnaturação e a diluição das bibliotecas preparadas para um ensaio de sequenciação e para a preparação de um controlo PhiX opcional. Este passo aplica-se à maioria dos tipos de bibliotecas.
<i>Manual de primers personalizados do NextSeq (documento n.º 15057456)</i>	Fornecer informações sobre a utilização dos primers de sequenciação personalizados em vez dos primers de sequenciação da Illumina.
<i>Ajuda do BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Fornecer informações sobre a utilização do BaseSpace® e opções de análise disponíveis.

Visite a [página de assistência do instrumento NextSeq 550Dx](#) no sítio Web da Illumina para aceder à documentação, transferências de software, formação online e perguntas mais frequentes.

Componentes do instrumento

O instrumento NextSeq 550Dx inclui um monitor com ecrã táctil, uma barra de estado e 4 compartimentos.

Figura 1 Componentes do instrumento



- A **Compartimento de aquisição de imagens** — Inclui a célula de fluxo para a sequenciação ou o adaptador BeadChip para a digitalização.
- B **Monitor com ecrã táctil** — Permite a configuração no instrumento e a preparação utilizando a interface do software de controlo.
- C **Barra de estado** — Indica o estado do instrumento como em processamento (azul), necessita de atenção (laranja) ou pronto para sequenciar (verde).
- D **Compartimento de tampão** — Inclui o cartucho de tampão e o recipiente de reagentes gastos.
- E **Compartimento de reagentes** — Inclui o cartucho de reagentes.
- F **Compartimento do filtro de ar** — Inclui o filtro de ar. Aceda ao filtro a partir da parte traseira do instrumento.
- G **Botão de alimentação** — Liga ou desliga o instrumento e o computador do instrumento.

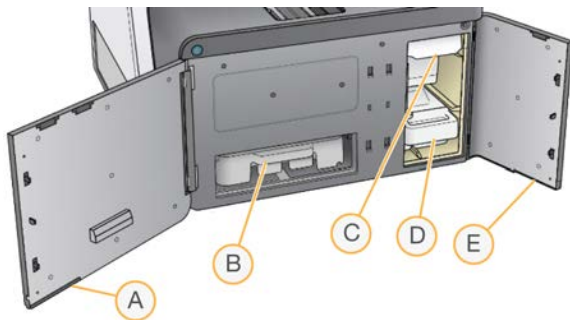
Compartimento de aquisição de imagens

O compartimento de aquisição de imagens inclui o estrado, que inclui três pinos de alinhamento para posicionar a célula de fluxo para a sequenciação ou o adaptador BeadChip para a digitalização. Depois de carregar a célula de fluxo ou o adaptador BeadChip, a porta do compartimento de aquisição de imagens fecha-se automaticamente e move os componentes para a posição.

Compartimentos de reagentes e tampão

A configuração de um ensaio de sequenciação no instrumento NextSeq 550Dx exige o acesso ao compartimento de reagentes e ao compartimento de tampão para carregar os consumíveis do ensaio e esvaziar o recipiente de reagentes gastos.

Figura 2 Compartimentos de reagentes e tampão



- A **Porta do compartimento de reagentes** — Delimita o compartimento de reagentes com um trinco por baixo da área inferior direita da porta. O compartimento de reagentes inclui o cartucho de reagentes.
- B **Cartucho de reagentes** — O cartucho de reagentes é um consumível de uma única utilização previamente cheio.
- C **Cartucho de tampão** — O cartucho de tampão é um consumível de uma única utilização previamente cheio.
- D **Recipiente de reagentes gastos** — Os reagentes gastos são recolhidos para eliminação após cada ensaio.
- E **Porta do compartimento de tampão** — Delimita o compartimento de tampão com um trinco por baixo do canto inferior esquerdo da porta.

Compartimento do filtro de ar

O compartimento do filtro de ar inclui o filtro de ar e está localizado na parte traseira do instrumento. Substitua o filtro de ar a cada 90 dias. Para obter informações sobre a substituição do filtro, consulte [Substituir o filtro de ar na página 40](#).

Software NextSeq 550Dx

O software do instrumento inclui aplicações integradas que efetuam ensaios de sequenciação ou digitalizações em conjunto.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** — O software de controlo orienta-o ao longo dos passos para configurar um ensaio de sequenciação ou uma digitalização em conjunto.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA)** — Para os ensaios de sequenciação, o RTA efetua a análise de imagens e a identificação de bases durante o ensaio. O instrumento NextSeq 550Dx utiliza o RTA v2, que inclui importantes diferenças na arquitetura e funcionalidades em relação às versões anteriores. Para obter mais informações, consulte a secção [Real-Time Analysis na página 57](#).

Ícones de estado

Um ícone de estado no canto superior direito do controlo assinala quaisquer alterações nas condições durante a configuração do ensaio ou durante o ensaio.

Ícone de estado	Nome do estado	Descrição
	Estado OK	O sistema está normal.
	A processar	O sistema está a processar.
	Aviso	Ocorreu um aviso. Os avisos não interrompem um ensaio nem exigem uma ação antes de prosseguir.
	Erro	Ocorreu um erro. Os erros exigem uma ação antes de prosseguirem o ensaio.
	Assistência necessária	Ocorreu uma notificação que exige a atenção. Consulte a mensagem para obter informações adicionais.

Quando ocorre uma alteração na condição, o ícone pisca para o alertar. Selecione o ícone para ver uma descrição da condição. Selecione **Acknowledge** (Confirmar) para aceitar a mensagem e **Close** (Fechar) para fechar a caixa de diálogo.



NOTA

Confirmar uma mensagem restabelece o ícone e a mensagem é apresentada a cinzento. A mensagem continua a ser visível para o utilizador se este selecionar o ícone, mas desaparece assim que se reinicia o NCS.

Botão de alimentação

O botão de alimentação na parte frontal do NextSeq 550Dx liga a alimentação do instrumento e o computador do instrumento. O botão de alimentação executa as ações seguintes, dependendo do estado de alimentação do instrumento. Por predefinição, o NextSeq 550Dx arranca no modo de diagnóstico.

Para obter informações sobre o encerramento do instrumento, consulte [Encerrar o instrumento na página 43](#).

Estado de alimentação	Ação
A alimentação do instrumento está desligada	Prima por breves instantes o botão para ligar a alimentação.
A alimentação do instrumento está ligada	Prima por breves instantes o botão para desligar a alimentação. É apresentada uma caixa de diálogo no ecrã para confirmar um encerramento normal do instrumento.
A alimentação do instrumento está ligada	Prima e mantenha premido o botão de alimentação durante 10 segundos para causar um encerramento forçado do instrumento e do computador do instrumento. Utilize este método para desligar o instrumento apenas se o instrumento não responder às suas ações.



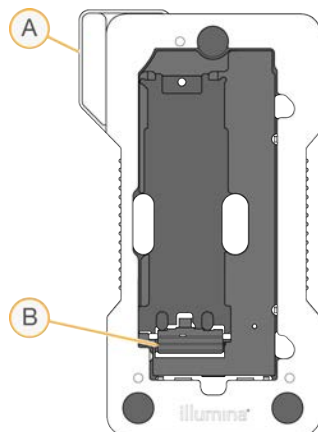
NOTA

Desligar o instrumento durante um ensaio de sequenciação termina imediatamente o ensaio. Terminar um ensaio é uma ação final. Os consumíveis do ensaio não podem ser reutilizados e os dados de sequenciação do ensaio não são guardados.

Descrição geral do adaptador BeadChip reutilizável

O adaptador BeadChip reutilizável inclui o BeadChip durante a digitalização. O BeadChip é fixado na prateleira embutida do adaptador com o grampo de retenção. Em seguida, o adaptador BeadChip é carregado no estrado no compartimento de imagiologia.

Figura 3 Adaptador BeadChip reutilizável



- A Adaptador BeadChip
- B Grampo de retenção

Descrição geral dos consumíveis de sequenciação

A realização de um ensaio de sequenciação no instrumento NextSeq 550Dx no modo de investigação exige um kit NextSeq 500/550 de uma única utilização ou um kit de reagentes de saída elevada NextSeq 550Dx. Cada kit inclui uma célula de fluxo e os reagentes necessários para um ensaio de sequenciação.

A célula de fluxo, o cartucho de reagentes e o cartucho de tampão utilizam a identificação por radiofrequência (RFID) para o controlo e compatibilidade exatos dos consumíveis.

NOTA



Mantenha os consumíveis de sequenciação armazenados nas respetivas embalagens até estarem prontos a serem utilizados.

Se utilizar um kit de reagentes de saída elevada NextSeq 550Dx para um ensaio no modo de investigação, todos os componentes devem ser provenientes do mesmo lote de kits. Não pode ser utilizado um kit NextSeq 500/550 para um ensaio no modo de diagnóstico.

Etiquetas de compatibilidade dos kits

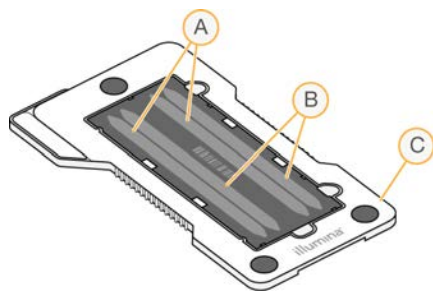
Os componentes do kit são identificados com indicadores codificados por cores para demonstrar a compatibilidade entre as células de fluxo e os cartuchos de reagentes. Utilize sempre um cartucho de reagentes e célula de fluxo compatíveis. O cartucho de tampão é universal.

Cada célula de fluxo e cartucho de reagentes está identificado com **High** (Elevada) ou **Mid** (Intermédia). Verifique sempre a etiqueta quando preparar os consumíveis para um ensaio.

Tipo de kit	Marcação na etiqueta
Componentes do kit de saída elevada	
Componentes do kit de saída intermédia	

Descrição geral da célula de fluxo

Figura 4 Cartucho da célula de fluxo



- A Par de pistas A — Pistas 1 e 3
- B Par de pistas B — Pistas 2 e 4
- C Quadro do cartucho da célula de fluxo

A célula de fluxo é um substrato à base de vidro no qual os clusters são gerados e a reação de sequenciação é realizada. A célula de fluxo é encaixada num cartucho da célula de fluxo.

A célula de fluxo contém 4 pistas cujas imagens são adquiridas em pares.

- ▶ Para as pistas 1 e 3 (par de pistas A), são adquiridas as imagens ao mesmo tempo.
- ▶ Para as pistas 2 e 4 (par de pistas B), são adquiridas as imagens quando a aquisição de imagens do par de pistas A estiver concluída.

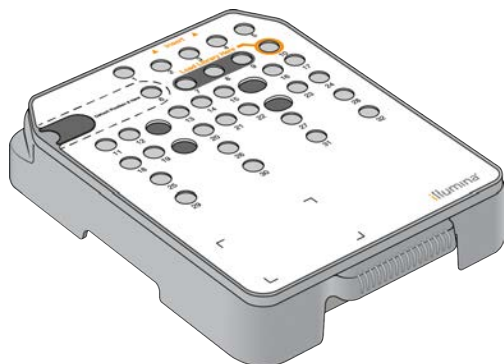
Embora a célula de fluxo tenha 4 pistas, apenas uma biblioteca individual ou conjunto de bibliotecas agrupadas é sequenciada na célula de fluxo. As bibliotecas são carregadas no cartucho de reagentes a partir de um reservatório único e são transferidas automaticamente para a célula de fluxo para todas as 4 pistas.

São adquiridas imagens de cada pista em pequenas áreas de aquisição de imagens, designadas blocos. Para obter mais informações, consulte *Blocos da célula de fluxo na página 63*.

Descrição geral do cartucho de reagentes

O cartucho de reagentes é um consumível de uma única utilização com reservatórios de controlo RFID e com selo de alumínio que são previamente cheios com reagentes de sequenciação e clustering.

Figura 5 Cartucho de reagentes



O cartucho de reagentes inclui um reservatório designado para carregar bibliotecas preparadas. Após o início do ensaio, as bibliotecas são transferidas automaticamente do reservatório para a célula de fluxo. Vários reservatórios estão reservados para a lavagem automática pós-ensaio. A solução de lavagem é introduzida a partir do cartucho de tampão nos reservatórios reservados, através do sistema, e depois para o recipiente de reagentes gastos.

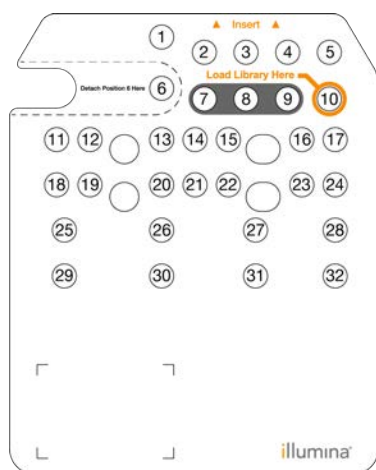


AVISO

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte a FDS em support.illumina.com/sds.html.

Reservatórios reservados

Figura 6 Reservatórios numerados



Posição	Descrição
7, 8 e 9	Reservados para os primers personalizados opcionais
10	Carregar bibliotecas

Para obter informações sobre os primers personalizados, consulte o *Manual de primers personalizados do NextSeq (documento n.º 15057456)*.

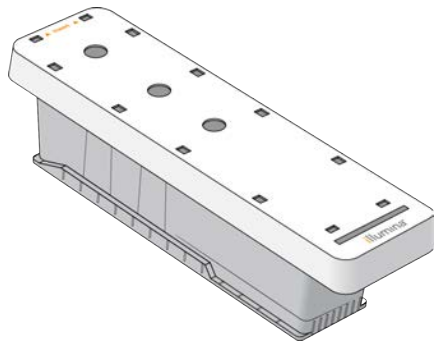
Reservatório amovível na posição n.º 6

O cartucho de reagentes previamente cheio inclui um reagente de desnaturação na posição 6 que contém formamida. Para facilitar a eliminação segura de qualquer reagente não usado após o ensaio de sequenciação, o reservatório na posição 6 é amovível. Para obter mais informações, consulte *Remover o reservatório usado da posição n.º 6 na página 23*.

Descrição geral do cartucho de tampão

O cartucho de tampão é um consumível de uma única utilização que contém três reservatórios que são previamente cheios com tampões e solução de lavagem. O conteúdo do cartucho de tampão é suficiente para sequenciar uma célula de fluxo.

Figura 7 Cartucho de tampão



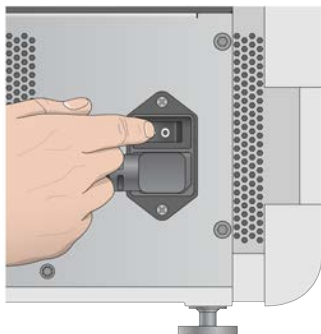
Capítulo 2 Introdução

Ligar o instrumento	11
Personalizar as definições do sistema	12
Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador	13

Ligar o instrumento

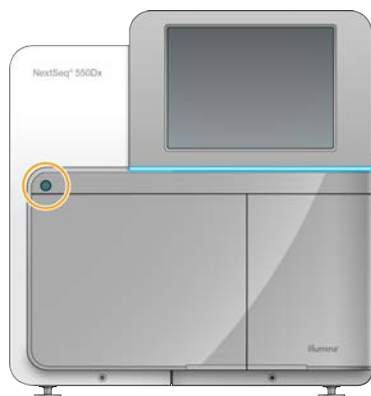
Coloque o interruptor de alimentação na posição I (ligada).

Figura 8 Interruptor de alimentação localizado na parte traseira do instrumento



- 1 Prima o botão de alimentação acima do compartimento de reagentes. O botão de alimentação liga a alimentação do instrumento e inicia o computador e o software do instrumento integrado. Por predefinição, o instrumento arranca no modo de diagnóstico.

Figura 9 Botão de alimentação localizado na parte frontal do instrumento



- 2 Aguarde até que o sistema operativo termine o carregamento. O software operativo NextSeq 550Dx (NOS) inicia e inicializa automaticamente o sistema. Após a conclusão do passo de inicialização, abre-se o ecrã Home (Início).
- 3 Introduza o seu nome de utilizador e palavra-passe do Local Run Manager. Para obter informações sobre as palavras-passe do Local Run Manager, consulte o *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.
- 4 Selecione **Login** (Iniciar sessão).
Abre-se o ecrã Home (Início), com os ícones Sequence (Sequência), Local Run Manager, Manage Instrument (Gerir instrumento) e Perform Wash (Realizar lavagem).

- 5 Utilize o comando Reboot to RUO (Reinicializar para o RUO) no NOS para encerrar o instrumento em segurança e reinicializar no modo de investigação.
 - ▶ Selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
 - ▶ Selecione **Reboot / Shut Down** (Reinicializar / Encerrar).
 - ▶ Selecione **Reboot to RUO** (Reinicializar para o RUO).
- 6 Aguarde até que o sistema operativo termine o carregamento.
O NCS inicia e inicializa o sistema automaticamente. Após a conclusão do passo de inicialização, abre-se o ecrã Home (Início).
- 7 Se o seu sistema tiver sido configurado para solicitar credenciais de início de sessão, inicie sessão no Windows utilizando o nome de utilizador e a palavra-passe para o seu local.

**NOTA**

Se não tiver a certeza em que modo se encontra o instrumento, consulte *Indicadores de modo do instrumento*.

Indicadores de modo do instrumento

A tabela seguinte apresenta os indicadores de modo do instrumento no ecrã NCS ou NOS. Para obter informações sobre como mudar do modo de investigação para o modo de diagnóstico, consulte *Opções de reinicialização e encerramento na página 43*.

Modo	Ecrã inicial	Barra de cores	Orientação do ícone de estado
Modo de diagnóstico	Bem-vindo ao NextSeqDx	Azul	Horizontal
Modo de investigação	Bem-vindo ao NextSeq	Laranja	Vertical

Personalizar as definições do sistema

O software de controlo inclui definições do sistema personalizáveis para o seguinte.

- ▶ Preferências de entrada
- ▶ Definições de áudio
- ▶ Nome do instrumento
- ▶ Preferências de configuração do ensaio
- ▶ Purga dos reagentes não usados

Personalizar o avatar e a alcunha do instrumento

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 2 Para atribuir uma imagem de avatar preferida para o seu instrumento, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até à imagem.
- 3 No campo Nick Name (Alcunha), introduza um nome preferido para o instrumento.
- 4 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e sair do ecrã.
A imagem e o nome são apresentados no canto superior esquerdo de cada ecrã.

Definir a opção do teclado e indicador de áudio

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 2 Selecione a caixa de verificação **Use on-screen keyboard** (Utilizar o teclado no ecrã) para ativar o teclado no ecrã para introduzir os dados no instrumento.
- 3 Selecione a caixa de verificação **Play audio** (Reproduzir o áudio) para ligar os indicadores de áudio para os seguintes eventos.
 - ▶ Aquando da inicialização do instrumento
 - ▶ Quando se inicia um ensaio
 - ▶ Quando ocorrem certos erros
 - ▶ Quando é necessária a interação do utilizador
 - ▶ Quando um ensaio concluir
- 4 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e sair do ecrã.

Definir as opções de configuração do ensaio

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 2 Selecione a caixa de verificação **Use Advanced Load Consumables** (Utilizar consumíveis de carregamento avançado) para ativar a opção para carregar todos os consumíveis do ensaio num único ecrã.
- 3 Selecione a caixa de verificação **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Ignorar a confirmação da verificação pré-ensaio) para iniciar a sequenciação ou a digitalização automaticamente após uma verificação automática bem-sucedida.
- 4 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e sair do ecrã.

Definir a opção de purga automática

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 2 Selecione a caixa de verificação **Purge Consumables at End of Run** (Purgar os consumíveis no final do ensaio) para purgar os reagentes não usados do cartucho de reagentes para o recipiente de reagentes gastos, automaticamente após cada ensaio.



NOTA

Purgar os consumíveis automaticamente adiciona um tempo adicional ao fluxo de trabalho.

- 3 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e sair do ecrã.

Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador

Os consumíveis e equipamentos seguintes são utilizados para a preparação dos consumíveis, sequenciação e manutenção do instrumento.

Consumíveis fornecidos pelo utilizador para ensaios de sequenciação

Consumível	Fabricante	Finalidade
1 N NaOH (hidróxido de sódio)	Fornecedor geral do laboratório	Desnaturação de bibliotecas, diluída a 0,2 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Fornecedor geral do laboratório	Desnaturação de bibliotecas
Toalhas com álcool isopropílico a 70% ou Etanol a 70%	VWR, catálogo n.º 95041-714 (ou equivalente) Fornecedor geral do laboratório	Finalidade geral e limpeza da célula de fluxo
Pano de laboratório, libertação reduzida de pelo	VWR, catálogo n.º 21905-026 (ou equivalente)	Finalidade geral e limpeza da célula de fluxo

Consumíveis fornecidos pelo utilizador para a manutenção do instrumento

Consumível	Fabricante	Finalidade
NaOCl, 5% (hipoclorito de sódio)	Sigma-Aldrich, catálogo n.º 239305 (ou equivalente de grau laboratorial)	Lavar o instrumento utilizando a lavagem manual pós-ensaio; diluído para 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, catálogo n.º P7949	Lavar o instrumento utilizando as opções de lavagem manual; diluído para 0,05%
Água, grau laboratorial	Fornecedor geral do laboratório	Lavar o instrumento (lavagem manual)
Filtro de ar	Illumina, catálogo n.º 20022240	Limpar o ar que o instrumento aspira para efeitos de arrefecimento

Diretrizes para água laboratorial

Utilize água laboratorial ou desionizada para realizar procedimentos no instrumento. Nunca utilize água da torneira. Utilize apenas água dos seguintes graus ou equivalente:

- ▶ Água desionizada
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Água de 18 Megaohms (MΩ)
- ▶ Água Milli-Q
- ▶ Água Super-Q
- ▶ Água para biologia molecular

Equipamento fornecido pelo utilizador

Item	Origem
Congelador, -25 °C a -15 °C, sem gelo	Fornecedor geral do laboratório
Frigorífico, 2 °C a 8 °C	Fornecedor geral do laboratório

Capítulo 3 Sequenciação

Introdução	15
Fluxo de trabalho de sequenciação	16
Preparar o cartucho de reagentes	16
Preparar a célula de fluxo	17
Preparar bibliotecas para sequenciação	17
Configurar um ensaio de sequenciação	18
Monitorizar o progresso do ensaio	25
Lavagem automática pós-ensaio	27

Introdução

Para realizar um ensaio de sequenciação no instrumento NextSeq 550Dx, prepare um cartucho de reagentes e célula de fluxo e, em seguida, siga as indicações do software para configurar e iniciar o ensaio. A geração de clusters e a sequenciação são realizadas no instrumento. Após o ensaio, inicia automaticamente uma lavagem do instrumento utilizando os componentes já carregados no instrumento.

Geração de clusters

Durante a geração de clusters, as moléculas de ADN individuais estão vinculadas à superfície da célula de fluxo e, em seguida, são amplificadas para formar clusters.

Sequenciação

É realizada a aquisição de imagens dos clusters utilizando química de sequenciação de dois canais e combinações de filtros específicas a cada um dos nucleótidos identificados com fluorescência. Após a conclusão da aquisição de imagens de um bloco na célula de fluxo, é adquirida a imagem do bloco seguinte. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciação. Após a análise das imagens, o software executa a identificação de bases, a filtragem e a pontuação de qualidade.

Monitorize o progresso do ensaio e as estatísticas a partir da interface do software de controlo, a partir do separador Run (Ensaio) no BaseSpace ou a partir de um computador ligado à rede utilizando o software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Consulte [Sequencing Analysis Viewer na página 27](#).

Análise

À medida que o ensaio avança, o software de controlo transfere automaticamente os ficheiros de identificação de bases (BCL) para o BaseSpace ou para a localização de saída especificada para a análise secundária.

Estão disponíveis vários métodos de análise, dependendo da sua aplicação. Para obter mais informações, consulte a [ajuda do BaseSpace \(help.basespace.illumina.com\)](#).

Duração do ensaio de sequenciação

A duração do ensaio de sequenciação depende do número de ciclos realizados. O comprimento máximo do ensaio é um ensaio de extremidade emparelhada de 150 ciclos cada leitura (2 x 150), mais até 8 ciclos cada para 2 leituras de indexação.

Número de ciclos numa leitura

Num ensaio de sequenciação, o número de ciclos realizados numa leitura é 1 ciclo adicional ao número de ciclos analisados. Por exemplo, um ensaio de 150 ciclos de extremidade emparelhada executa leituras de 151 ciclos (2×151) para um total de 302 ciclos. No final do ensaio, são analisados 2×150 ciclos. O ciclo extra é necessário para os cálculos de fase e pré-fase.

Fluxo de trabalho de sequenciação



Preparar o cartucho de reagentes

Certifique-se de que segue as instruções do cartucho de reagentes cuidadosamente para uma sequenciação bem-sucedida.

- 1 Retire o cartucho de reagentes do armazenamento de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Escolha um dos seguintes métodos para descongelar os reagentes. Não mergulhe o cartucho. Depois de descongelar o cartucho, seque-o antes de prosseguir para o passo seguinte.

Temperatura	Tempo para descongelar	Limite de estabilidade
Banho com água de 15 °C a 30 °C	60 minutos	Não exceder 6 horas
2 °C a 8 °C	7 horas	Não exceder 5 dias

**NOTA**

Se estiver a descongelar mais de um cartucho no mesmo banho de água, permita um tempo de descongelamento adicional.

- Inverta o cartucho 5 vezes para misturar os reagentes.
- Inspeccione o fundo do cartucho para garantir que os reagentes estão descongelados e sem precipitados. Confirme que as posições 29, 30, 31 e 32 estão descongeladas, uma vez que são as maiores e demorarão mais tempo a descongelar.
- Bata delicadamente na bancada para reduzir as bolhas de ar. Para obter os melhores resultados, prossiga diretamente para o carregamento da amostra e configuração do ensaio.

**AVISO**

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte a FDS em support.illumina.com/sds.html.

Preparar a célula de fluxo

- Retire uma nova embalagem de célula de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- Coloque a embalagem da célula de fluxo desembalhada de parte à temperatura ambiente durante 30 minutos.

**NOTA**

Se a embalagem de alumínio estiver intacta, a célula de fluxo pode permanecer à temperatura ambiente durante até 12 horas. Evite o arrefecimento e aquecimento repetidos da célula de fluxo.

Preparar bibliotecas para sequenciação

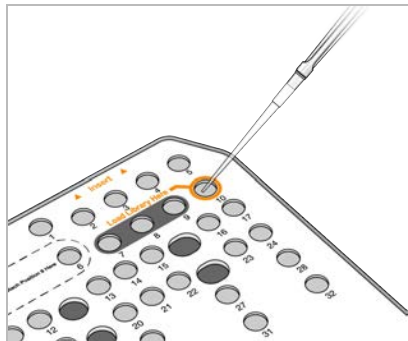
Desnaturar e diluir bibliotecas

Desnature e dilua as suas bibliotecas a um volume de carregamento de 1,3 ml e uma concentração de carregamento de 1,8 pM. Na prática, a concentração de carregamento pode variar dependendo da preparação da biblioteca e dos métodos de quantificação. Para obter instruções, consulte o *Manual de desnaturação e diluição das bibliotecas do sistema NextSeq (documento n.º 15048776)*.

Carregar bibliotecas para o cartucho de reagentes

- 1 Limpe o selo de alumínio que cobre o reservatório n.º 10 com a etiqueta **Load Library Here** (Carregar a biblioteca aqui) utilizando um pano com libertação reduzida de pelo.
- 2 Perfure o selo com a ponta de uma pipeta limpa de 1 ml.
- 3 Carregue 1,3 ml de bibliotecas 1,8 pM preparadas no reservatório n.º 10 com a etiqueta **Load Library Here** (Carregar biblioteca aqui). Evite tocar no selo de alumínio enquanto distribui as bibliotecas.

Figura 10 Carregar bibliotecas



Configurar um ensaio de sequenciação

- 1 A partir do ecrã Home (Início), selecione **Experiment** (Experimentar) e, em seguida, selecione **Sequence** (Sequência).

O comando de sequência abre a porta do compartimento de aquisição de imagens, liberta os consumíveis de um ensaio anterior e abre a série de ecrãs de configuração do ensaio. É normal ocorrer um curto atraso.

Se o instrumento estiver configurado para o BaseSpace, é-lhe solicitado que inicie sessão no BaseSpace. Se o instrumento estiver configurado para o modo autónomo, o próximo passo é carregar a célula de fluxo.

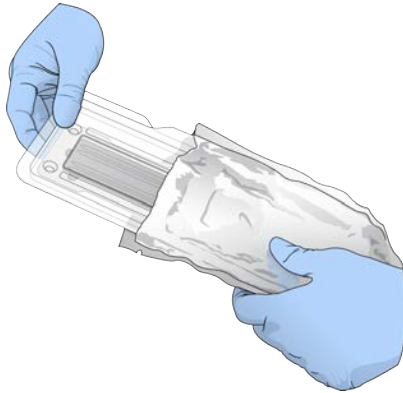
Início de sessão no BaseSpace

- 1 Introduza o seu nome de utilizador e palavra-passe do BaseSpace.
- 2 Selecione **Next** (Seguinte).

Carregar a célula de fluxo

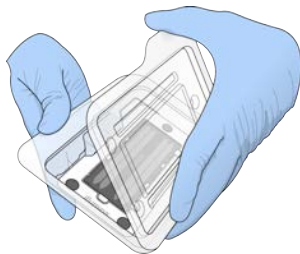
- 1 Remova a célula de fluxo usada de um ensaio anterior.
- 2 Remova a célula de fluxo da embalagem de alumínio.

Figura 11 Remover da embalagem de alumínio



- 3 Abra a embalagem articulada de plástico transparente e remova a célula de fluxo.

Figura 12 Remover da embalagem articulada



- 4 Limpe a superfície de vidro da célula de fluxo com um toalhete de álcool que não largue pelos. Seque o vidro com um pano de laboratório de libertação reduzida de pelo.

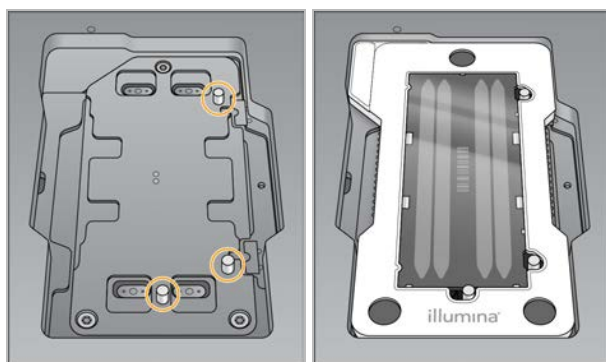


NOTA

Certifique-se de que a superfície de vidro da célula de fluxo está limpa. Se necessário, repita o passo de limpeza.

- 5 Alinhe a célula de fluxo sobre os pinos de alinhamento e coloque a célula de fluxo no estrado.

Figura 13 Carregar a célula de fluxo



- 6 Selecione **Load** (Carregar).
A porta fecha-se automaticamente, a ID da célula de fluxo aparece no ecrã e os sensores são verificados.



NOTA

Mantenha as mãos afastadas da porta da célula de fluxo enquanto se estiver a fechar para evitar beliscões.

- 7 Selecione **Next** (Seguinte).

Esvaziar o recipiente de reagentes gastos

- 1 Abra a porta do compartimento de tampão com o trinco por baixo do canto inferior esquerdo da porta.
- 2 Remova o recipiente de reagentes gastos e elimine o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.

Figura 14 Remover o recipiente de reagentes gastos



NOTA

Enquanto remove o recipiente, coloque a sua outra mão por baixo para apoiar.

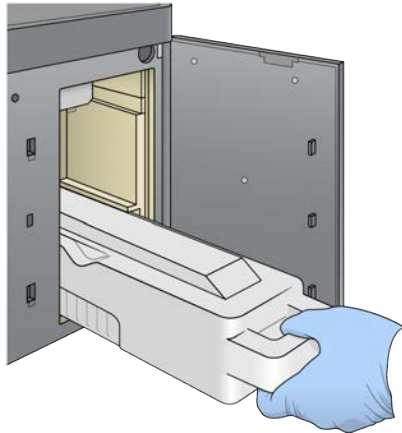


AVISO

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte a FDS em support.illumina.com/sds.html.

- 3 Deslize o recipiente de reagentes gastos vazio para o interior do compartimento de tampão até à sua imobilização. Um clique sonoro indica que o recipiente está na posição.

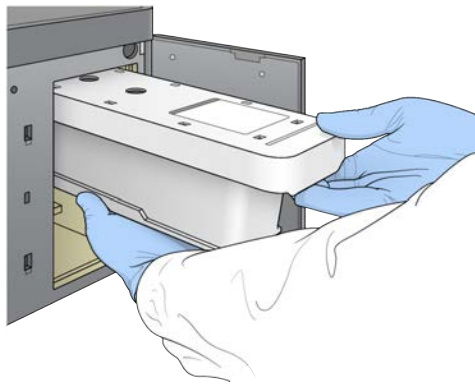
Figura 15 Carregar o recipiente de reagentes gastos vazio



Carregar o cartucho de tampão

- 1 Remova o cartucho de tampão usado do compartimento superior. É necessária alguma força para levantar e depois extrair o cartucho de tampão.
- 2 Deslize um novo cartucho de tampão para dentro do compartimento de tampão até ficar imóvel. Um clique sonoro indica que o cartucho está na devida posição, a ID do cartucho de tampão é apresentada no ecrã e o sensor é verificado.

Figura 16 Carregar o cartucho de tampão



- 3 Feche a porta do compartimento de tampão e seleccione **Next** (Seguinte).

Carregar o cartucho de reagentes

- 1 Abra a porta do compartimento de reagentes com o trinco por baixo do canto inferior direito da porta.
- 2 Remova o cartucho de reagentes usado do compartimento de reagentes. Elimine o conteúdo não usado de acordo com as normas aplicáveis.



AVISO

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte a FDS em support.illumina.com/sds.html.

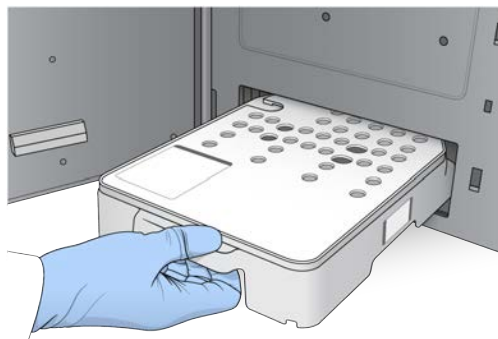


NOTA

Para facilitar a eliminação segura do reagente não usado, o reservatório na posição 6 é amovível. Para obter mais informações, consulte *Remover o reservatório usado da posição n.º 6* na página 23.

- 3 Deslize o cartucho de reagentes no compartimento de reagentes até o cartucho ficar imóvel e, em seguida, feche a porta do compartimento de reagentes.

Figura 17 Carregar o cartucho de reagentes

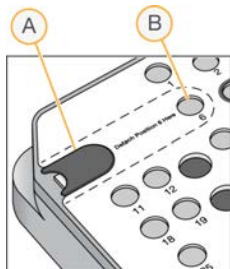


- 4 Selecione **Load** (Carregar).
O software desloca o cartucho para a posição automaticamente (~30 segundos), a ID do cartucho de reagentes aparece no ecrã e os sensores são verificados.
- 5 Selecione **Next** (Seguinte).

Remover o reservatório usado da posição n.º 6

- 1 Depois de remover o cartucho de reagentes **usados** do instrumento, remova a cobertura de borracha de proteção sobre a ranhura junto à posição n.º 6.

Figura 18 Posição amovível n.º 6



- A Cobertura de borracha de proteção
- B Posição n.º 6

- 2 Pressione a patilha de plástico transparente e empurre para a esquerda para ejetar o reservatório.
- 3 Elimine o reservatório de acordo com as normas aplicáveis.

Especificar os parâmetros do ensaio

Os passos no ecrã Run Setup (Configuração do ensaio) diferem com base na configuração do sistema:

- ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** — O ecrã Run Setup (Configuração do ensaio) enumera os ensaios que foram configurados utilizando o separador Prep (Preparação) do BaseSpace. Se o ensaio pretendido não aparecer no ecrã Run Setup (Configuração do ensaio), certifique-se de que o ensaio está marcado para sequenciação no BaseSpace.
- ▶ **Standalone (Autónomo)** — O ecrã Run Setup (Configuração do ensaio) inclui campos para definir os parâmetros do ensaio.

Selecionar o ensaio disponível (Configuração BaseSpace)

- 1 Selecione o nome de um ensaio a partir da lista de ensaios disponíveis. Utilize as setas para cima e para baixo para percorrer a lista ou introduza o nome de um ensaio no campo Search (Pesquisar).
- 2 Selecione **Next** (Seguinte).
- 3 Confirme os parâmetros do ensaio.
 - ▶ **Run Name** (Nome do ensaio) — Nome do ensaio conforme designado no BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID da biblioteca) — Nome das bibliotecas agrupadas conforme designado no BaseSpace.
 - ▶ **Recipe** (Receita) — Nome da receita, **NextSeq High** (NextSeq elevada) ou **NextSeq Mid** (NextSeq intermédia) dependendo do cartucho de reagentes utilizado para o ensaio.
 - ▶ **Read Type** (Tipo de leitura) — Leitura única ou Leitura emparelhada.
 - ▶ **Read Length** (Comprimento da leitura) — Número de ciclos para cada leitura.
 - ▶ **[Opcional]** Custom Primers (Primers personalizados), se aplicável.
- 4 **[Opcional]** Selecione o botão **Edit** (Editar) para alterar os parâmetros do ensaio. Quando concluir, selecione **Save** (Guardar).


- ▶ **Run parameters** (Parâmetros do ensaio) — Altere o número de leituras ou o número de ciclos por leitura.
- ▶ **Custom primers** (Primers personalizados) — Altere as definições para os primers personalizados. Para obter mais informações, consulte o *Manual de primers personalizados do NextSeq (documento n.º 15057456)*.
- ▶ **Purge consumables for this run** (Purgar os consumíveis para este ensaio) — Altere a definição para purgar os consumíveis automaticamente após o ensaio atual.

5 Selecione **Next** (Seguinte).

Introduzir os parâmetros do ensaio (Configuração autónoma)


- 1 Introduza um nome do ensaio da sua preferência.
- 2 **[Opcional]** Introduza uma ID da biblioteca da sua preferência.
- 3 Selecione um tipo de leitura **Single Read** (Leitura única) ou **Paired End** (Leitura emparelhada).
- 4 Introduza o número de ciclos para cada leitura no ensaio de sequenciação.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Introduza um valor até 151 ciclos.
 - ▶ **Index 1** (Indexação 1) — Introduza o número de ciclos necessários para o primer de Indexação 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Indexação 2) — Introduza o número de ciclos necessários para o primer de Indexação 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Leitura 1) — Introduza um valor até 151 ciclos. Este valor é normalmente o mesmo número de ciclos que a Leitura 1.

O software de controlo confirma as suas entradas utilizando os critérios seguintes:

 - ▶ O total de ciclos não excede os ciclos máximos permitidos
 - ▶ Os ciclos para a Leitura 1 são superiores aos 5 ciclos utilizados para a geração de modelos
 - ▶ Os ciclos de Leitura da indexação não excedem os ciclos da Leitura 1 e Leitura 2
- 5 **[Opcional]** Se estiver a utilizar primers personalizados, selecione a caixa de verificação para os primers utilizados. Para obter mais informações, consulte o *Manual de primers personalizados do NextSeq (documento n.º 15057456)*.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Primer personalizado para a Leitura 1.
 - ▶ **Index 1** (Indexação 1) — Primer personalizado para a Indexação 1.
 - ▶ **Index 2** (Indexação 2) — Primer personalizado para a Indexação 1.
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Primer personalizado para a Leitura 1.
- 6 **[Opcional]** Selecione o botão **Advanced Settings**  (Definições avançadas) para alterar os parâmetros do ensaio.
 - ▶ Na lista pendente Recipe (Receita), selecione uma receita. São listadas apenas as receitas compatíveis.
 - ▶ **Output folder location** (Localização da pasta de saída) — Altere a localização da pasta de saída para o ensaio atual. Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até um local de rede.
 - ▶ **Included file** (Ficheiro incluído) — Selecione os ficheiros para incluir na Output Folder (Pasta de saída) que podem ser úteis se for necessária uma análise adicional. Por exemplo, ficheiros de manifesto e listas de amostras.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Purgar os consumíveis para este ensaio) — Altere a definição para purgar os consumíveis automaticamente após o ensaio atual.
 - ▶ **Use run monitoring for this run** (Utilizar a monitorização do ensaio para este ensaio) — Altere a definição para utilizar a monitorização do ensaio no BaseSpace.
- 7 Selecione **Next** (Seguinte).

Rever a verificação pré-ensaio

O software executa uma verificação automatizada pré-ensaio do sistema. Durante a verificação, os indicadores seguintes são apresentados no ecrã:

- ▶ **Marca de verificação cinzenta** — A verificação ainda não foi realizada.
- ▶ **Ícone de progresso**  — A verificação está em curso.
- ▶ **Marca de verificação verde** — A verificação foi aprovada.
- ▶ **X vermelho** — A verificação foi reprovada. Para quaisquer itens reprovados, é necessária uma ação antes de poder prosseguir. Consulte *Resolver erros de verificação automática na página 46*.

Para parar uma verificação automatizada em curso, selecione o botão **Cancel** (Cancelar). Para reiniciar a verificação, selecione o botão **Retry** (Tentar novamente). A verificação é retomada na primeira verificação incompleta ou falhada.

Para ver os resultados de cada verificação individual numa categoria, selecione o separador de categoria.

Iniciar o ensaio

Quando a verificação automatizada pré-ensaio estiver concluída, selecione **Start** (Iniciar). O ensaio de sequenciação inicia.

Para configurar o sistema para iniciar o ensaio automaticamente após uma verificação bem-sucedida, consulte *Definir as opções de configuração do ensaio na página 13*.

Monitorizar o progresso do ensaio

- 1 Monitorize o progresso do ensaio, as intensidades e as pontuações de qualidade à medida que as métricas aparecem no ecrã.

Figura 19 Progresso do ensaio de sequenciação e métricas



- A **Run progress** (Progresso do ensaio) — Apresenta o passo atual e o número de ciclos concluídos para cada leitura. A barra de progresso não é proporcional à taxa do ensaio de cada passo. A data e hora estimadas para a conclusão do ensaio são apresentadas na parte inferior.
- B **Q-Score** (Pontuação de Q) — Apresenta a distribuição das pontuações de qualidade (pontuações de Q). Consulte *Pontuação de qualidade na página 61*.
- C **Intensity** (Intensidade) — Apresenta o valor das intensidades dos clusters do 90^o percentil para cada bloco. As cores do gráfico indicam cada base: vermelho é A, verde é C, azul é G e preto é T.
- D **Cluster Density (K/mm²)** (Densidade dos clusters [K/mm²]) — Apresenta o número de clusters detetados para o ensaio.

- E **Clusters Passing Filter (%)** (Clusters que passam pelo filtro [%]) — Apresenta a percentagem de clusters que passam pelo filtro. Consulte *Clusters que passam pelo filtro na página 60*.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Rendimento estimado [Gb]) — Apresenta o número de bases projetadas para o ensaio.
- G **Lot Information** (Informações do lote) — Apresenta os números de lote dos consumíveis de sequenciação. Para a célula de fluxo, apresenta o número de série.
- H **End Run** (Terminar ensaio) — Interrompe o ensaio de sequenciação em curso. Não é possível reutilizar os consumíveis.



NOTA

Depois de selecionar Home (Início), não é possível regressar para visualizar as métricas do ensaio. No entanto, as métricas estão acessíveis no BaseSpace ou podem ser visualizadas a partir de um computador autónomo utilizando o Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Ciclos para as métricas do ensaio

As métricas do ensaio são apresentadas em diferentes pontos num ensaio.

- ▶ Durante os passos de geração de clusters, não são apresentadas quaisquer métricas.
- ▶ Os primeiros 5 ciclos são reservados para a geração de modelos.
- ▶ As métricas do ensaio são apresentadas após o ciclo 25, incluindo a densidade dos clusters, os clusters que passam pelo filtro, o rendimento e as pontuações de qualidade.

Transferência de dados

Estado	Illumina BaseSpace	BaseSpace Onsite	Instrumento autónomo
Ligado			
Ligado e a transferir os dados			
Desligado			
Desativado			

Dependendo da configuração de análise selecionada, é apresentado um ícone no ecrã durante o ensaio para indicar o estado da transferência de dados.

Se a transferência de dados for interrompida durante o ensaio, os dados são armazenados temporariamente no computador do instrumento. Quando a ligação é restaurada, a transferência de dados é retomada automaticamente. Se a ligação não for restaurada antes de o ensaio terminar, remova manualmente os dados do computador do instrumento antes de poder iniciar um ensaio subsequente.

Serviço de cópia do ensaio

O pacote de software do sistema NextSeq 550Dx inclui um Serviço de cópia do ensaio. O RTA v2 solicita ao serviço que copie os ficheiros de um local de origem para um local de destino e o serviço processa os pedidos de cópia pela ordem recebida. Se ocorrer uma exceção, o ficheiro é novamente colocado em fila de espera para a cópia com base no número de ficheiros na fila para cópia.

Sequencing Analysis Viewer

O software Sequencing Analysis Viewer apresenta as métricas de sequenciação geradas durante o ensaio. As métricas são apresentadas sob a forma de diagramas, gráficos e tabelas com base nos dados gerados pelo RTA e gravados nos ficheiros InterOp. As métricas são atualizadas à medida que o ensaio avança. Selecione **Refresh** (Atualizar) em qualquer altura durante o ensaio para ver as métricas atualizadas. Para obter mais informações, consulte o *Manual do utilizador do Sequencing Analysis Viewer (n.º da peça 15020619)*.

O Sequencing Analysis Viewer está incluído no software instalado no computador do instrumento. Também pode instalar o Sequencing Analysis Viewer noutro computador ligado à mesma rede que o instrumento para monitorizar as métricas do ensaio por via remota.

Lavagem automática pós-ensaio

Quando o ensaio de sequenciação estiver concluído, o software inicia uma lavagem automática pós-ensaio utilizando a solução de lavagem fornecida no cartucho de tampão e NaOCl fornecido no cartucho de reagentes. Se a opção para purgar os consumíveis do ensaio estiver ativada, a purga ocorre antes da lavagem automática pós-ensaio.

A lavagem automática pós-ensaio demora aproximadamente 90 minutos. Quando a lavagem estiver concluída, o botão Home (Início) fica ativo. Os resultados de sequenciação permanecem visíveis no ecrã durante a lavagem.

Após a lavagem

Após a lavagem, as unidades de aspiração permanecem na posição inferior para impedir a entrada de ar no sistema. Deixe os cartuchos no devido lugar até ao ensaio seguinte.

Capítulo 4 Digitalização

Introdução	29
Fluxo de trabalho da digitalização	30
Transferir a pasta DMAP	30
Carregar o BeadChip no adaptador	31
Configurar uma digitalização	32
Monitorizar o progresso da digitalização	34

Introdução

Para efetuar uma digitalização num instrumento NextSeq 550Dx, necessita dos seguintes componentes do ensaio:

- ▶ Um BeadChip hibridizado e corado
- ▶ O adaptador BeadChip reutilizável
- ▶ Ficheiros Decode Map (DMAP) para o BeadChip que está a utilizar
- ▶ Um ficheiro de manifesto para o tipo de BeadChip que está a utilizar
- ▶ Um ficheiro de cluster para o tipo de BeadChip que está a utilizar

Os ficheiros de saída são gerados durante a digitalização e, em seguida, são colocados em fila para a transferência para a pasta de saída especificada.

Efetue a análise utilizando o software BlueFuse Multi, que exige que os dados de digitalização estejam disponíveis no formato de ficheiro de identificação de genótipos (GTC). Por predefinição, o instrumento NextSeq 550Dx gera dados normalizados e identificações de genótipos associadas no formato de um ficheiro GTC. Opcionalmente, pode configurar o instrumento para gerar ficheiros de dados de intensidade adicionais (IDAT). Para obter mais informações, consulte *Configuração da digitalização do BeadChip na página 55*.

Decode File Client

A pasta DMAP contém informações que identificam as localizações das esferas no BeadChip e quantificam o sinal associado a cada esfera. Uma pasta DMAP é única para cada código de barras do BeadChip.

O utilitário Decode File Client permite-lhe transferir as pastas DMAP diretamente dos servidores da Illumina utilizando o protocolo HTTP padrão.

Para o acesso ao Decode File Client, vá até à [página de assistência do Decode File Client](https://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) no sítio Web da Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Instale o Decode File Client num computador com acesso ao local de rede da pasta DMAP.

Para obter mais informações, consulte *Transferir a pasta DMAP na página 30*.

Ficheiros de manifesto e ficheiros de clusters

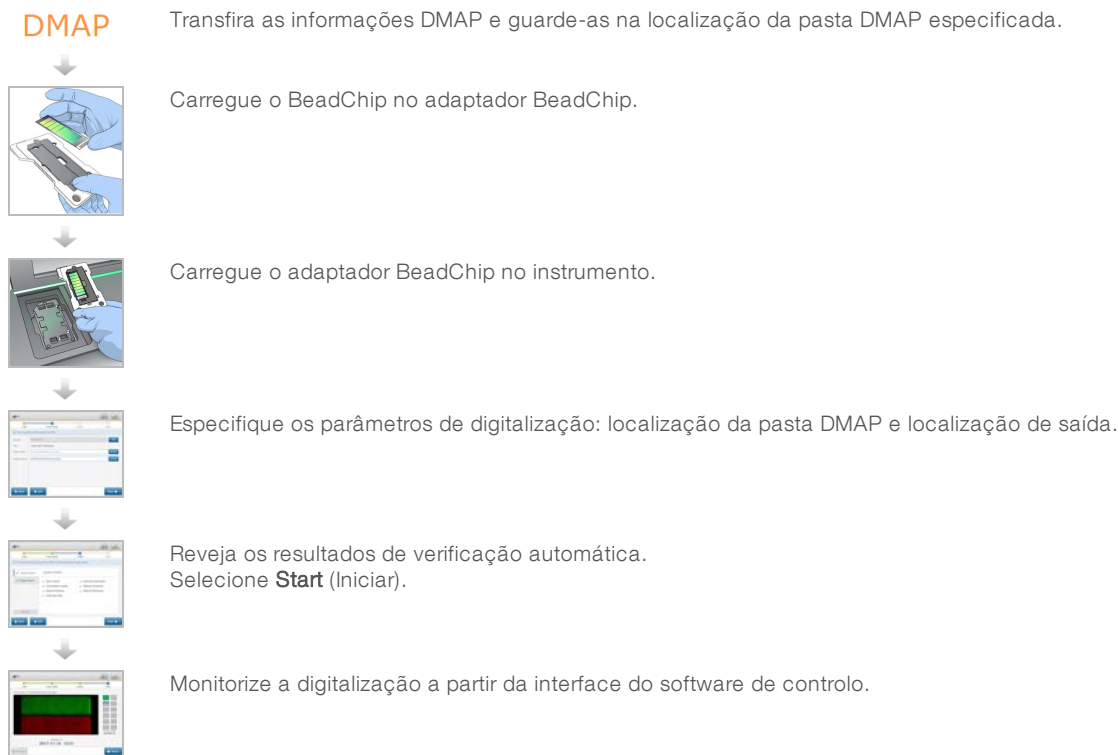
Para cada BeadChip, o software exige o acesso a um ficheiro de manifesto e ficheiro de cluster. Cada ficheiro de manifesto e de cluster é único a um tipo de BeadChip. Certifique-se de que utiliza ficheiros de clusters que incluem NS550 no nome do ficheiro. Estes ficheiros são compatíveis com o sistema NextSeq 550Dx.

- ▶ **Ficheiro de manifesto** — Os ficheiros de manifesto descrevem o SNP ou conteúdo de investigação num BeadChip. Os ficheiros de manifesto utilizam o formato de ficheiro *.bpm.
- ▶ **Ficheiros de clusters** — Os ficheiros de clusters descrevem as posições dos clusters para o conjunto de genotipagem da Illumina e são utilizados quando se analisam dados para efetuar a identificação de genótipos. Os ficheiros de clusters utilizam o formato de ficheiro *.egt.

A localização dos ficheiros é especificada no ecrã BeadChip Scan Configuration (Configuração da digitalização do BeadChip). No ecrã Home (Início) do NCS, selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento), **System Configuration** (Configuração do sistema) e, em seguida, **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da digitalização do BeadChip).

Quando o instrumento NextSeq 550Dx é instalado, o representante da Illumina transfere estes ficheiros e especifica o caminho no software de controlo. Não é necessário alterar estes ficheiros, exceto em caso de perda ou se estiver disponível uma nova versão. Para obter mais informações, consulte [Substituição de ficheiros de manifesto e ficheiros de clusters na página 52](#).

Fluxo de trabalho da digitalização



Transferir a pasta DMAP

Pode aceder à pasta DMAP utilizando o Decode File Client por conta ou por BeadChip (vista predefinida).

Aceder à pasta DMAP por conta

- 1 No separador principal do Decode File Client, selecione uma opção de transferência:
 - ▶ AutoPilot
 - ▶ Nem todos os BeadChips já foram transferidos
 - ▶ Todos os BeadChips
 - ▶ BeadChips por ordem de compra
 - ▶ BeadChips por código de barras
- 2 Introduza as informações necessárias.
- 3 Localize a pasta DMAP que pretende transferir.

- 4 Certifique-se de que tem espaço livre suficiente na pasta de destino da transferência.
- 5 Inicie a transferência. Visualize o estado da transferência no separador Download Status and Log (Estado da transferência e registo).
- 6 Guarde a pasta DMAP na localização da pasta DMAP especificada.

Aceder à pasta DMAP por BeadChip

- 1 Identifique os BeadChips utilizando 2 das seguintes opções:
 - ▶ Código de barras do BeadChip
 - ▶ ID da caixa BeadChip
 - ▶ Número da ordem de compra
 - ▶ Número da ordem de venda
- 2 Localize a pasta DMAP que pretende transferir.
- 3 Certifique-se de que tem espaço livre suficiente na pasta de destino da transferência.
- 4 Inicie a transferência. Visualize o estado da transferência no separador Download Status and Log (Estado da transferência e registo).
- 5 Guarde a pasta DMAP na localização da pasta DMAP especificada.

Carregar o BeadChip no adaptador

- 1 Pressione o grampo de retenção no adaptador para baixo. O grampo inclina-se para trás ligeiramente para abrir.
- 2 Ao segurar no BeadChip pelas extremidades, posicione o BeadChip com o código de barras próximo do grampo de retenção e coloque o BeadChip na prateleira embutida do adaptador.

Figura 20 Carregar o BeadChip no adaptador



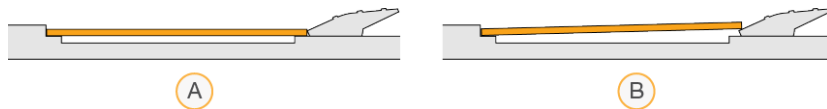
- 3 Utilizando as aberturas em ambos os lados do BeadChip, certifique-se de que o BeadChip está assente na prateleira embutida do adaptador.

Figura 21 Colocar e prender o BeadChip



- 4 Liberte delicadamente o grampo de retenção para prender o BeadChip.
- 5 Inspeccione o BeadChip a partir da lateral para garantir que o BeadChip está assente nivelado no adaptador. Se necessário, volte a posicionar o BeadChip.

Figura 22 Inspeccionar a posição do BeadChip



- A Posição correta — O BeadChip está plano no adaptador quando o grampo é libertado.
B Posição incorreta — O BeadChip não está plano quando o grampo é libertado.

Configurar uma digitalização

- 1 A partir do ecrã Home (Início), selecione **Experiment** (Experimentar) e, em seguida, selecione **Scan** (Digitalizar).

O comando de digitalização abre a porta do compartimento de aquisição de imagens, liberta os consumíveis de um ensaio anterior (se presentes) e abre a série de ecrãs de configuração da digitalização. É normal ocorrer um curto atraso.

Descarregar os consumíveis de sequenciação

Se os consumíveis de sequenciação usados estiverem presentes quando estiver a configurar uma digitalização, o software pede-lhe que descarregue o cartucho de reagentes e o cartucho de tampão antes de prosseguir para o passo seguinte.

- 1 Se lhe for indicado, remova os consumíveis de sequenciação usados de um ensaio de sequenciação anterior.
 - a Remova o cartucho de reagentes do compartimento de reagentes. Elimine o conteúdo não usado de acordo com as normas aplicáveis.
 - b Remova o cartucho de tampão usado do compartimento de tampão.



AVISO

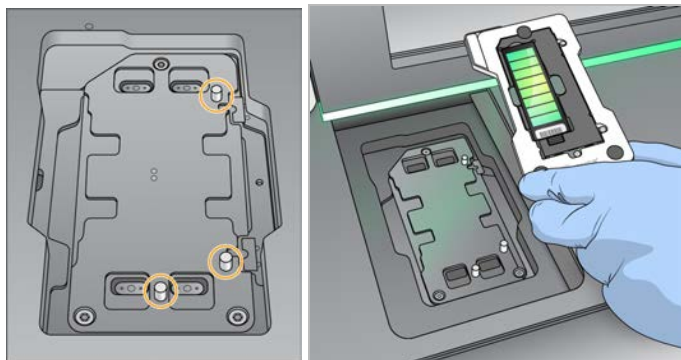
Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte a FDS em support.illumina.com/sds.html.

- 2 Remova a célula de fluxo do compartimento de aquisição de imagens.
- 3 Feche as portas do compartimento de reagentes e do compartimento de tampão.

Carregar o adaptador BeadChip

- 1 Utilize os pinos de alinhamento para posicionar o adaptador BeadChip no estrado.

Figura 23 Carregar o adaptador BeadChip




- 2 Selecione **Load** (Carregar).
A porta fecha-se automaticamente, a ID do BeadChip aparece no ecrã e os sensores são verificados. É normal ocorrer um curto atraso. Se não for possível ler o código de barras do BeadChip, é apresentada uma caixa de diálogo que lhe permite introduzir o código de barras manualmente. Consulte *O software não consegue ler o código de barras do BeadChip* na página 51.
- 3 Selecione **Next** (Seguinte).

Configuração da digitalização

- 1 No ecrã Scan Setup (Configuração da digitalização), confirme as informações seguintes:
 - ▶ **Barcode** (Código de barras) — o software lê o código de barras do BeadChip quando o BeadChip é carregado. Se o código de barras tiver sido introduzido manualmente, o botão Edit (Editar) é apresentado para realizar outras alterações.
 - ▶ **Type** (Tipo) — O campo de tipo de BeadChip é preenchido automaticamente com base no código de barras do BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Localização de DMAP) — A localização da pasta DMAP é especificada no ecrã BeadChip Scan Configuration (Configuração da digitalização do BeadChip). Para alterar a localização apenas para a digitalização atual, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até à localização correta.
 - ▶ **Output Location** (Localização de saída) — A localização de saída é especificada no ecrã BeadChip Scan Configuration (Configuração da digitalização do BeadChip). Para alterar a localização apenas para a digitalização atual, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até à localização preferida.
- 2 Selecione **Next** (Seguinte).

Rever a verificação pré-ensaio

O software executa uma verificação automatizada pré-ensaio do sistema. Durante a verificação, os indicadores seguintes são apresentados no ecrã:

- ▶ **Marca de verificação cinzenta** — A verificação ainda não foi realizada.
- ▶ **Ícone de progresso**  — A verificação está em curso.

- ▶ **Marca de verificação verde** — A verificação foi aprovada.
- ▶ **X vermelho** — A verificação foi reprovada. Para quaisquer itens reprovados, é necessária uma ação antes de poder prosseguir. Consulte *Resolver erros de verificação automática na página 46*.

Para parar uma verificação automatizada em curso, selecione o botão **Cancel** (Cancelar). Para reiniciar a verificação, selecione o botão **Retry** (Tentar novamente). A verificação é retomada na primeira verificação incompleta ou falhada.

Para ver os resultados de cada verificação individual numa categoria, selecione o separador de categoria.

Iniciar a digitalização

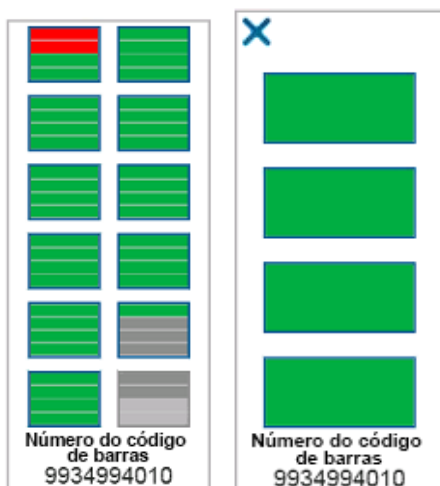
Quando a verificação automatizada estiver concluída, selecione **Start** (Iniciar). A digitalização inicia.

Para configurar o sistema para iniciar a digitalização automaticamente após uma verificação bem-sucedida, consulte *Definir as opções de configuração do ensaio na página 13*.

Monitorizar o progresso da digitalização

- 1 Monitorize o progresso da digitalização utilizando a imagem BeadChip. Cada cor na imagem indica o estado da digitalização.
 - ▶ **Cinzentos-claros** — Não digitalizado
 - ▶ **Cinzentos-escuros** — Digitalizado, mas não registado.
 - ▶ **Verde** — Digitalizado e registado com êxito.
 - ▶ **Vermelho** — Falha na digitalização e registo.Se o registo falhar, pode voltar a digitalizar as amostras que contêm secções falhadas. Consulte *Falha na digitalização do BeadChip na página 51*.
- 2 Selecione a imagem BeadChip para alternar entre uma vista completa e uma vista detalhada de uma amostra selecionada.
 - ▶ A vista completa apresenta as amostras no BeadChip e as secções em cada amostra.
 - ▶ A vista detalhada apresenta cada secção na amostra selecionada.

Figura 24 Imagem BeadChip: vista completa e vista detalhada





NOTA

Terminar uma digitalização é uma ação final. Se terminar a digitalização antes da sua conclusão, os dados da digitalização **não** são guardados.

Transferência de dados

Os dados são colocados na fila para a transferência para a pasta de saída de digitalização quando a digitalização estiver concluída. Os dados são temporariamente gravados no computador do instrumento. A pasta temporária é eliminada automaticamente do computador do instrumento quando se inicia uma digitalização subsequente.

O tempo necessário para transferir os dados depende da sua ligação de rede. Antes de iniciar uma digitalização subsequente, certifique-se de que os dados foram gravados na pasta de saída. Para verificar, certifique-se de que os ficheiros GTC estão presentes na pasta de códigos de barras. Para obter mais informações, consulte [Estrutura de pastas de saída de digitalização na página 67](#).

Se a ligação for interrompida, a transferência de dados é retomada automaticamente quando a ligação é restaurada. Cada ficheiro tem um temporizador de 1 hora depois de ser colocado na fila para transferência para a pasta de saída. Quando o temporizador expirar ou se o instrumento for reinicializado antes da conclusão da transferência, os dados não são gravados na pasta de saída.

Capítulo 5 Manutenção

Introdução	37
Realizar uma lavagem manual	37
Substituir o filtro de ar	40
Atualizações de software	41
Opções de reinicialização e encerramento	43

Introdução

Os procedimentos de manutenção incluem lavagens manuais do instrumento e atualizações de software do sistema, quando disponíveis.

- ▶ **Lavagens do instrumento** — Uma lavagem automática pós-ensaio após cada sequenciação mantém o desempenho do instrumento. No entanto, é necessária uma lavagem manual periodicamente em determinadas condições. Consulte *Realizar uma lavagem manual na página 37*.
- ▶ **Atualizações de software** — Quando está disponível uma versão atualizada do software do sistema, pode instalar automaticamente a atualização através de uma ligação ao BaseSpace ou manualmente depois de transferir o instalador a partir do sítio Web da Illumina. Consulte *Atualizações de software na página 41*.
- ▶ **Substituição do filtro de ar** — A substituição regular do filtro de ar garante um fluxo de ar apropriado através do instrumento.

Manutenção preventiva

A Illumina recomenda programar um serviço de manutenção preventiva por ano. Se não tiver em vigor um contrato de assistência, contacte o seu Gestor de conta territorial ou a Assistência técnica da Illumina para organizar um serviço de manutenção preventiva cobrável.

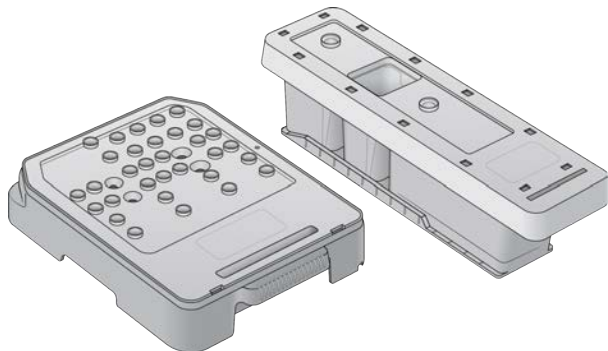
Realizar uma lavagem manual

As lavagens manuais são iniciadas a partir do ecrã Home (Início). As opções de lavagem incluem a Lavagem rápida e a Lavagem manual pós-ensaio.

Tipos de lavagem	Descrição
Lavagem rápida Duração: 20 minutos	Irriga o sistema com uma solução de lavagem fornecida pelo utilizador de água de grau laboratorial e Tween 20 (cartucho de lavagem de tampão). <ul style="list-style-type: none">• É necessária a cada 14 dias em que o instrumento esteja inativo com o cartucho de reagentes e cartucho de tampão nos devidos lugares.• É necessária a cada 7 dias em que o instrumento esteja no estado seco (cartucho de reagentes e cartucho de tampão removidos).• É necessária após um encerramento.
Lavagem manual pós-ensaio Duração: 90 minutos	Irriga o sistema com uma solução de lavagem fornecida pelo utilizador de água de grau laboratorial e Tween 20 (cartucho de lavagem de tampão) e 0,12% de hipoclorito de sódio (cartucho de lavagem de reagentes). É necessária se a lavagem automática pós-ensaio não tiver sido realizada.

Uma lavagem manual exige o cartucho de lavagem de reagentes e cartucho de lavagem de tampão fornecidos com o instrumento, bem como uma célula de fluxo usada. Uma célula de fluxo usada pode ser utilizada até 20 vezes para as lavagens do instrumento.

Figura 25 Cartucho de lavagem de reagentes e cartucho de lavagem de tampão



Preparar uma lavagem manual pós-ensaio

Escolha se pretende preparar uma lavagem manual pós-ensaio conforme descrito abaixo ou preparar uma lavagem rápida (secção seguinte). Se pretender realizar uma lavagem manual pós-ensaio, ignore a secção de lavagem rápida e continue para *Carregar uma célula de fluxo usada e os cartuchos de lavagem na página 39*.

Consumíveis fornecidos pelo utilizador	Volume e descrição
NaOCl	1 ml, diluído a 0,12% Carregado no cartucho de lavagem de reagentes (posição n.º 28)
100% Tween 20 Água de grau laboratorial	Utilizada para preparar a solução de lavagem de 125 ml de Tween 20 a 0,05% Carregado no cartucho de lavagem de tampão (reservatório central)

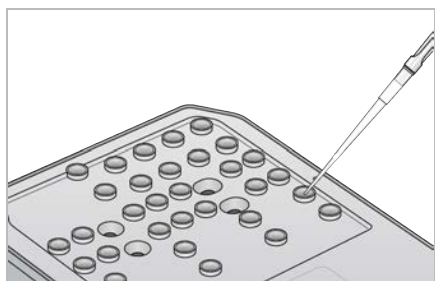


NOTA

Utilize sempre uma diluição nova de NaOCl preparada nas últimas **24 horas**. Se preparar um volume superior a 1 ml, armazene a diluição restante entre 2 °C e 8 °C para utilizar nas 24 horas seguintes. Caso contrário, elimine a diluição restante de NaOCl.

- Combine os seguintes volumes num tubo de microcentrifugação para obter 1 ml de NaOCl a 0,12%:
 - ▶ 5% de NaOCl (24 µl)
 - ▶ Água de grau laboratorial (976 µl)
- Inverta o tubo para misturar.
- Adicione 1 ml de NaOCl a 0,12% ao cartucho de lavagem de reagentes. O reservatório correto é equivalente à posição n.º 28 no cartucho previamente cheio.

Figura 26 Carregar NaOCl



- 4 Combine os seguintes volumes para obter uma solução de lavagem de Tween 20 a 0,05%:
 - ▶ 100% Tween 20 (62 µl)
 - ▶ Água de grau laboratorial (125 ml)
- 5 Adicione 125 ml de solução de lavagem ao reservatório central do cartucho de lavagem de tampão.
- 6 Selecione **Perform Wash** (Realizar lavagem) e, em seguida, selecione **Manual Post-Run Wash** (Lavagem manual pós-ensaio).

Preparar uma lavagem rápida

Pode preparar uma lavagem rápida conforme descrito abaixo como uma alternativa à opção *Preparar uma lavagem manual pós-ensaio* na página 38.

Consumíveis fornecidos pelo utilizador	Volume e descrição
100% Tween 20	Utilizada para preparar a solução de lavagem de 40 ml de Tween 20 a 0,05%
Água de grau laboratorial	Carregado no cartucho de lavagem de tampão (reservatório central)

- 1 Combine os seguintes volumes para obter uma solução de lavagem de Tween 20 a 0,05%:
 - ▶ 100% Tween 20 (20 µl)
 - ▶ Água de grau laboratorial (40 ml)
- 2 Adicione 40 ml de solução de lavagem ao reservatório central do cartucho de lavagem de tampão.
- 3 Selecione **Perform Wash** (Realizar lavagem) e, em seguida, selecione **Quick Wash** (Lavagem rápida).

Carregar uma célula de fluxo usada e os cartuchos de lavagem

- 1 Se não estiver presente uma célula de fluxo usada, carregue uma célula de fluxo usada. Selecione **Load** (Carregar) e, em seguida, selecione **Next** (Seguinte).
- 2 Remova o recipiente de reagentes gastos e elimine o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.



AVISO

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte a FDS em support.illumina.com/sds.html.

- 3 Deslize o recipiente de reagentes gastos vazio para o interior do compartimento de tampão até à sua imobilização.
- 4 Remova o cartucho de tampão usado do ensaio anterior, se estiver presente.
- 5 Carregue o cartucho de lavagem de tampão que contém a solução de lavagem.
- 6 Remova o cartucho de reagentes usados do ensaio anterior, se estiver presente.
- 7 Carregue o cartucho de lavagem de reagentes.
- 8 Selecione **Next** (Seguinte). A verificação pré-lavagem inicia automaticamente.

Iniciar a lavagem

- 1 Selecione **Start** (Iniciar).
- 2 Quando a lavagem estiver concluída, selecione **Home** (Início).

Após a lavagem

Após a lavagem, as unidades de aspiração permanecem na posição inferior para impedir a entrada de ar no sistema. Deixe os cartuchos no devido lugar até ao ensaio seguinte.

Substituir o filtro de ar

O filtro de ar garante o fluxo de ar através do instrumento. O software operativo NextSeq 550Dx no modo de diagnóstico do instrumento apresenta uma notificação para trocar o filtro de ar a cada 90 dias. Quando lhe for solicitado, selecione **Remind in 1 day** (Lembrar em 1 dia) ou siga o procedimento seguinte e selecione **Filter Changed** (Filtro trocado). A contagem de 90 dias é reiniciada depois de seleccionar **Filter Changed** (Filtro trocado).

- 1 Remova o novo filtro de ar da embalagem e escreva a data na qual o instalou no quadro do filtro.
- 2 Na parte traseira do instrumento, pressione a parte superior do tabuleiro do filtro para libertar o tabuleiro.
- 3 Agarre na parte superior do tabuleiro do filtro e puxe para cima para levantar completamente o tabuleiro, extraíndo-o do instrumento.
- 4 Remova e elimine o filtro de ar usado.
- 5 Introduza o novo filtro de ar no tabuleiro.

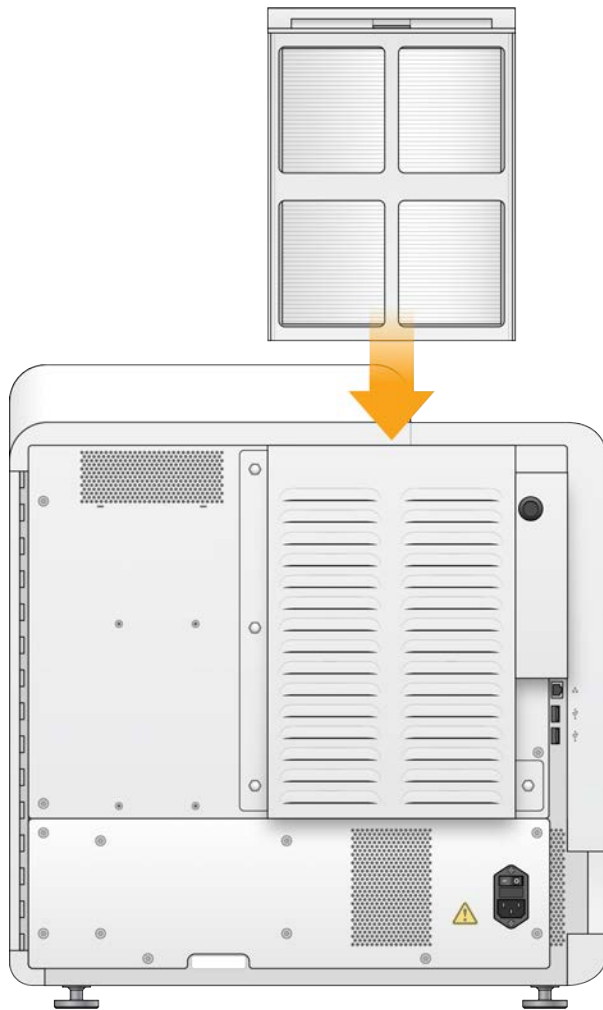


NOTA

O filtro de ar não funciona corretamente se estiver colocado ao contrário. Certifique-se de que introduz o filtro de ar no tabuleiro de modo a conseguir ver a seta “Para cima” e não conseguir ver a etiqueta de aviso. A seta deve apontar para a pega do tabuleiro do filtro.

- 6 Deslize o tabuleiro do filtro para dentro do instrumento. Empurre a parte superior do tabuleiro do filtro para baixo até encaixar no lugar.

Figura 27 Introdução do filtro de ar




Atualizações de software

As atualizações de software estão integradas num grupo de software designado Pacote do sistema, que inclui o software seguinte:

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Receitas NextSeq
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

Pode instalar as atualizações de software automaticamente utilizando uma ligação à Internet ou manualmente a partir de um local na rede ou unidade USB.

- ▶ **Atualizações automáticas** — Para os instrumentos ligados a uma rede com acesso à Internet, é apresentado um ícone de alerta  no botão **Manage Instrument** (Gerir instrumento) no ecrã Home (Início) quando está disponível uma atualização.
- ▶ **Atualizações manuais** — Transfira o instalador do Pacote do sistema a partir da [página de assistência do instrumento NextSeq 550Dx](#) no sítio Web da Illumina.

Atualização automática do software

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 3 Selecione **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Instalar a atualização já transferida do BaseSpace).
- 4 Selecione **Update** (Atualizar) para iniciar a atualização. Abre-se uma caixa de diálogo para confirmar o comando.
- 5 Siga as indicações no assistente de instalação:
 - a Aceite o acordo de licenciamento.
 - b Reveja as notas de edição.
 - c Reveja a lista de software incluído na atualização.

Quando a atualização estiver concluída, o software de controlo reinicia automaticamente.



NOTA

Se estiver incluída uma atualização de firmware, é necessário um reinício automático do sistema após a atualização do firmware.

Atualização manual do software

- 1 Transfira o instalador do Pacote do sistema a partir do sítio Web da Illumina e guarde-o numa localização na rede.
Alternativamente, copie o ficheiro de instalação do software numa pen USB portátil.
- 2 Selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 3 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 4 Selecione **Manually install the update from the following location** (Instalar manualmente a atualização a partir da seguinte localização).
- 5 Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até à localização do ficheiro de instalação do software e, em seguida, selecione **Update** (Atualizar).
- 6 Siga as indicações no assistente de instalação:
 - a Aceite o acordo de licenciamento.
 - b Reveja as notas de edição.
 - c Reveja a lista de software incluído na atualização.

Quando a atualização estiver concluída, o software de controlo reinicia automaticamente.



NOTA

Se estiver incluída uma atualização de firmware, é necessário um reinício automático do sistema após a atualização do firmware.

Opções de reinicialização e encerramento

Aceda às seguintes funcionalidades ao selecionar o botão Shut Down Options (Opções de encerramento):

- ▶ Restart (Reiniciar) — O instrumento abre no modo de diagnóstico (Dx).
- ▶ Shutdown (Encerrar) — O instrumento abre no modo de diagnóstico (Dx).
- ▶ Exit to Windows (Sair para o Windows) — Dependendo das permissões, pode fechar o NCS e ver o Windows.

Reiniciar para o modo de diagnóstico

Utilize o comando Restart (Reiniciar) para encerrar o instrumento em segurança e reinicializar no modo de diagnóstico. O modo de diagnóstico é o modo de arranque predefinido.

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **Shutdown Options** (Opções de encerramento).
- 3 Selecione **Restart** (Reiniciar).

Encerrar o instrumento

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **Shutdown Options** (Opções de encerramento).
- 3 Selecione **Shut Down** (Encerrar).
O comando de encerramento encerra o software em segurança e desliga a alimentação do instrumento. Aguarde, pelo menos, 60 segundos antes de ligar novamente o instrumento.



NOTA

Por predefinição, o instrumento arranca no modo de diagnóstico quando é ligado.



ATENÇÃO

Não reposicione o instrumento. Se posicionar o instrumento incorretamente pode afetar o alinhamento ótico e comprometer a integridade dos dados. Se for necessário reposicionar o instrumento, contacte o seu representante da Illumina.

Sair para o Windows

O comando Exit to Windows (Sair para o Windows) permite o acesso ao sistema operativo do instrumento e a qualquer pasta no computador do instrumento. O comando encerra em segurança o software e sai do Windows,

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **Shutdown Options** (Opções de encerramento).
- 3 Selecione **Exit to Windows** (Sair para o Windows).

Anexo A Resolução de problemas

Introdução	45
Ficheiros de resolução de problemas	45
Resolver erros de verificação automática	46
O recipiente de reagentes gastos está cheio	48
Fluxo de trabalho de rehibridação	49
Erros na digitalização e no BeadChip	51
Receitas personalizadas e pastas de receitas	52
Mensagem de erro RAID	52
Configurar as definições do sistema	53

Introdução

Para questões técnicas, visite as páginas de assistência do instrumento NextSeq 550Dx no sítio Web da Illumina. As páginas de assistência fornecem o acesso a documentação, transferências e perguntas mais frequentes.

Inicie sessão na sua conta MyIllumina para o acesso a boletins de assistência.

Para problemas com a qualidade do ensaio ou desempenho, contacte a Assistência técnica da Illumina. Consulte *Assistência técnica na página 73*.

Considere partilhar uma hiperligação para o resumo do ensaio no BaseSpace com a Assistência técnica da Illumina para facilitar a resolução de problemas.

Ficheiros de resolução de problemas

Um representante da Assistência técnica da Illumina pode solicitar cópias de ficheiros específicos do ensaio ou da digitalização para resolver problemas. Normalmente, são utilizados os seguintes ficheiros para a resolução de problemas.

Ficheiros de resolução de problemas para ensaios de sequenciação

Ficheiro principal	Pasta	Descrição
Ficheiro de informações do ensaio (RunInfo.xml)	Pasta raiz	Contém as seguintes informações: <ul style="list-style-type: none">• Nome do ensaio• Número de ciclos no ensaio• Número de ciclos em cada leitura• Se a leitura é uma leitura indexada• Número de faixas e blocos na célula de fluxo
Ficheiro de parâmetros do ensaio (RunParameters.xml)	Pasta raiz	Contém informações sobre os parâmetros do ensaio e componentes do ensaio. As informações incluem a RFID, o número de série, o número da peça e a data de validade.
Ficheiro de configuração RTA (RTAConfiguration.xml)	Pasta raiz	Contém as definições de configuração RTA para o ensaio. O ficheiro RTAConfiguration.xml é criado no início do ensaio.
Ficheiros InterOp (*.bin)	InterOp	Ficheiros de comunicação binária utilizados para o Sequencing Analysis Viewer. Os ficheiros InterOp são atualizados ao longo do ensaio.

Ficheiro principal	Pasta	Descrição
Ficheiros de registo	Registos	Os ficheiros de registo descrevem cada passo executado pelo instrumento para cada ciclo e indicam as versões de software e firmware utilizadas com o ensaio. O ficheiro designado [Nome do instrumento]_CurrentHardware.csv enumera os números de série dos componentes do instrumento.
Ficheiros de registo de erros (*ErrorLog*.txt)	Registos RTA	Registo de erros RTA. Os ficheiros de registo de erros são atualizados sempre que ocorre um erro.
Ficheiros de registo globais (*GlobalLog*.tsv)	Registos RTA	Registo de todos os eventos RTA. Os ficheiros de registo globais são atualizados ao longo do ensaio.

Erros RTA

Para a resolução de problemas com erros RTA, em primeiro lugar, verifique o registo de erros RTA, que está armazenado na pasta RTALogs (Registos RTA). Este ficheiro não está presente para ensaios bem-sucedidos. Inclua o registo de erros quando comunicar problemas à Assistência técnica da Illumina.

Ficheiros de resolução de problemas para digitalizações em conjunto

Ficheiro principal	Pasta	Descrição
Ficheiro de parâmetros da digitalização (ScanParameters.xml)	Pasta raiz	Contém informações sobre os parâmetros da digitalização. As informações incluem a data da digitalização, código de barras do BeadChip, localização do ficheiro de cluster e localização do ficheiro de manifesto.
Ficheiros de registo	Registos	Os ficheiros de registo descrevem cada passo executado no instrumento durante a digitalização.
Ficheiros de métricas	[Código de barras]	As métricas são fornecidas como métricas de amostra e como métricas de secção. [código de barras]_sample_metrics.csv — Para cada amostra e canal (vermelho e verde), indica a Percent Off Image (Porcentagem de imagens fora), Percent Outliers (Porcentagem de valores atípicos), P05, P50, P95, Avg FWHM (Média FWHM), FWHM Stddev (Desvio padrão FWHM) e Min Registration Score (Pontuação mínima de registo). [código de barras]_section_metrics.csv — Para cada secção e bloco, indica a Laser Z-position (Posição Z do laser), Through Focus Z-position (Posição Z através do foco), Red FWHM (FWHM vermelho), Green FWHM (FWHM verde), Red Avg Pixel Intensity (Intensidade de pixel média vermelha), Green Avg Pixel Intensity (Intensidade de pixel média verde), Red Registration Score (Pontuação de registo vermelho) e Green Registration Score (Pontuação de registo verde).
Ficheiros de repetição da digitalização	[Código de barras]	[código de barras]_rescan.flowcell — Indica as localizações do bloco ajustadas para uma repetição da digitalização, que incluem uma sobreposição de bloco a bloco aumentada.

Resolver erros de verificação automática

Se ocorrerem erros durante a verificação automática, utilize as seguintes ações recomendadas para resolver o erro. As verificações automáticas diferem para as digitalizações de sequenciação e em conjunto.

Verificações para ensaios de sequenciação

Se uma verificação pré-ensaio falhar, a RFID do cartucho de reagentes não é bloqueada e pode ser utilizada para um ensaio subsequente. No entanto, a RFID fica bloqueada depois de perfurar os selos de alumínio.

Verificações do sistema	Ação recomendada
Portas fechadas	Certifique-se de que as portas do compartimento estão fechadas.
Consumíveis carregados	Os sensores de consumíveis não estão a registar. Certifique-se de que cada consumível é carregado corretamente. Nos ecrãs de configuração do ensaio, selecione Back (Voltar) para regressar ao passo de carregamento e repita a configuração do ensaio.
Software necessário	Estão ausentes componentes essenciais do software. Efetue uma atualização manual do software para restaurar todos os componentes de software.
Espaço em disco no instrumento	O disco rígido do instrumento não tem espaço em disco suficiente para executar um ensaio. É possível que os dados de um ensaio anterior não tenham sido transferidos. Apague os dados do ensaio do disco rígido do instrumento.
Ligação de rede	A ligação de rede foi interrompida. Verifique o estado da rede e a ligação da rede física.
Espaço em disco na rede	A conta BaseSpace está cheia ou o servidor de rede está cheio.
Temperatura	Ação recomendada
Temperatura	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Sensores de temperatura	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Ventoinhas	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Sistema de aquisição de imagens	Ação recomendada
Limites de aquisição de imagens	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Passos e instalação Z	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Taxa de erro bit	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Registo da célula de fluxo	É possível que a célula de fluxo não esteja devidamente instalada. <ul style="list-style-type: none"> Nos ecrãs de configuração do ensaio, selecione Back (Voltar) para regressar ao passo da célula de fluxo. A porta do compartimento de aquisição de imagens abre-se. Descarregue e volte a carregar a célula de fluxo para garantir que está instalada corretamente.
Administração de reagentes	Ação recomendada
Resposta da válvula	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Bomba	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Mecanismo de tampão	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Recipiente de reagentes gastos vazio	Esvazie o recipiente de reagentes gastos e volte a carregar o recipiente vazio.

Verificações para digitalizações em conjunto

Verificações do sistema	Ação recomendada
Portas fechadas	Certifique-se de que as portas do compartimento estão fechadas.
Consumíveis carregados	Os sensores de consumíveis não estão a registar. Certifique-se de que cada consumível é carregado corretamente. Nos ecrãs de configuração do ensaio, selecione Back (Voltar) para regressar ao passo de carregamento e repita a configuração do ensaio.
Software necessário	Estão ausentes componentes essenciais do software. Efetue uma atualização manual do software para restaurar todos os componentes de software.
Verificar os ficheiros de entrada	Certifique-se de que o caminho para o ficheiro de clusters e ficheiro de manifesto está correto e que os ficheiros estão presentes.
Espaço em disco no instrumento	O disco rígido do instrumento não tem espaço em disco suficiente para executar um ensaio. É possível que os dados de um ensaio anterior não tenham sido transferidos. Apague os dados do ensaio do disco rígido do instrumento.
Ligação de rede	A ligação de rede foi interrompida. Verifique o estado da rede e a ligação da rede física.
Espaço em disco na rede	A conta BaseSpace está cheia ou o servidor de rede está cheio.
Sistema de aquisição de imagens	Ação recomendada
Limites de aquisição de imagens	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Passos e instalação Z	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Taxa de erro bit	Contacte a Assistência técnica da Illumina.
Centragem automática	Descarregue o adaptador BeadChip. Certifique-se de que o BeadChip está instalado no adaptador e, em seguida, volte a carregar o adaptador.

O recipiente de reagentes gastos está cheio

Inicie sempre um ensaio com um recipiente de reagentes gastos vazio.

Se iniciar um ensaio sem esvaziar o recipiente de reagentes gastos, os sensores do sistema fazem com que o software interrompa o ensaio quando o recipiente estiver cheio. Os sensores do sistema não podem interromper um ensaio durante o clustering, a ressíntese de extremidade emparelhada ou a lavagem automática pós-ensaio.

Quando o ensaio é interrompido, abre-se uma caixa de diálogo com opções para levantar as unidades de aspiração e esvaziar o recipiente completo.

Esvaziar o recipiente de reagentes gastos

- 1 Selecione **Raise Sippers** (Levantar unidades de aspiração).
- 2 Remova o recipiente de reagentes gastos e elimine o conteúdo corretamente.
- 3 Volte a colocar o recipiente vazio no compartimento de tampão.
- 4 Selecione **Continue** (Continuar). O ensaio é retomado automaticamente.

Fluxo de trabalho de rehibridação

Poderá ser necessário um ensaio de rehibridação se as métricas geradas durante os primeiros ciclos demonstrarem intensidades inferiores a 2500. Algumas bibliotecas de baixa diversidade podem exibir intensidades inferiores a 1000, o que é esperado e não pode ser resolvido com rehibridação.



NOTA

O comando End Run (Terminar ensaio) é uma ação final. O ensaio não pode ser retomado, os consumíveis não podem ser reutilizados e os dados de sequenciação do ensaio não são guardados.

Quando termina um ensaio, o software executa os passos seguintes antes de terminar o ensaio:

- ▶ Coloca a célula de fluxo num estado seguro.
- ▶ Desbloqueia a RFID da célula de fluxo para um ensaio posterior.
- ▶ Atribui uma data de validade de rehibridação à célula de fluxo.
- ▶ Grava os registos do ensaio para os ciclos concluídos. É normal ocorrer um atraso.
- ▶ Ignora a lavagem automática pós-ensaio.

Quando inicia um ensaio de rehibridação, o software executa os passos seguintes para realizar o ensaio:

- ▶ Cria uma pasta do ensaio com base num nome de ensaio único.
- ▶ Verifica se a data de rehibridação da célula de fluxo não passou da validade.
- ▶ Lava os reagentes. É normal ocorrer um atraso.
- ▶ Ignora o passo de clustering.
- ▶ Remove o primer anterior de Leitura 1.
- ▶ Efetua a hibridação de um novo primer de Leitura 1.
- ▶ Continua com a Leitura 1 e com o restante ensaio com base nos parâmetros do ensaio especificados.

Pontos para terminar um ensaio para rehibridação

É possível efetuar a rehibridação posterior apenas se terminar o ensaio nos seguintes pontos:

- ▶ **Após o ciclo 5** — As intensidades são apresentadas após o registo do modelo, o que exige os primeiros 5 ciclos de sequenciação. Embora seja seguro terminar um ensaio após o ciclo 1, é recomendado terminá-lo após o ciclo 5. Não termine um ensaio durante a geração de clusters.
- ▶ **Leitura 1 ou Leitura 1 de indexação** — Termine o ensaio *antes* de iniciar a ressíntese de extremidade emparelhada. Não é possível guardar a célula de fluxo para a rehibridação posterior depois de iniciar a ressíntese de extremidade emparelhada.

Consumíveis necessários

Um ensaio de rehibridação exige um novo cartucho de reagentes NextSeq 550Dx e cartucho de tampão, independentemente de quando o ensaio foi interrompido.

Terminar o ensaio atual

- 1 Selecione **End Run** (Terminar ensaio). Quando lhe for solicitado para confirmar o comando, selecione **Yes** (Sim).
- 2 Quando lhe for solicitado para guardar a célula de fluxo, selecione **Yes** (Sim). Anote a data de validade para rehibridação.

- 3 Remova a célula de fluxo guardada e coloque-a de parte entre 2 °C e 8 °C até estar pronto para configurar o ensaio de rehibridação.



NOTA

Pode armazenar a célula de fluxo durante no máximo 7 dias entre 2 °C e 8 °C na embalagem articulada de plástico *sem* a embalagem de dessecante. Para obter melhores resultados, efetue a rehibridação da célula de fluxo no prazo de 3 dias.

Realizar uma lavagem manual

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Perform Wash** (Realizar lavagem).
- 2 No ecrã Wash Selection (Seleção de lavagem), selecione **Manual Post-Run Wash** (Lavagem manual pós-ensaio). Consulte *Realizar uma lavagem manual na página 37*.



NOTA

Se não removeu o cartucho de reagentes e o cartucho de tampão do ensaio interrompido, pode utilizá-los para a lavagem manual. Caso contrário, efetue a lavagem manual com o cartucho de lavagem de reagentes e cartucho de lavagem de tampão.

Configurar um novo ensaio no separador de preparação do BaseSpace

- 1 Se o instrumento estiver configurado para o BaseSpace ou BaseSpace Onsite, configure um novo ensaio no separador Prep (Preparação) utilizando os mesmos parâmetros que o ensaio original.



SUGESTÃO

Clique no separador Pools, selecione a Pool ID (ID de pool) apropriada para reter as definições do ensaio anteriores e, em seguida, atribua um nome único para o novo ensaio.

Configurar um ensaio no instrumento

- 1 Prepare um novo cartucho de reagentes.
- 2 Se a célula de fluxo guardada tiver sido armazenada, permita que atinja a temperatura ambiente (15–30 minutos).
- 3 Limpe e carregue a célula de fluxo guardada.
- 4 Remova o recipiente de reagentes gastos e elimine o conteúdo corretamente e, em seguida, recarregue o recipiente vazio.
- 5 Carregue o novo cartucho de tampão e cartucho de reagentes.
- 6 No ecrã Run Setup (Configuração do ensaio), selecione uma das seguintes opções:
 - ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** — Selecione o ensaio e confirme os parâmetros do ensaio.
 - ▶ **Standalone** (Autónomo) — Introduza o nome do ensaio e especifique os mesmos parâmetros que no ensaio original.
- 7 Selecione **Next** (Seguinte) para prosseguir com a verificação pré-ensaio e inicie o ensaio.

Erros na digitalização e no BeadChip

O software não consegue ler o código de barras do BeadChip

Quando é apresentada a caixa de diálogo de erro de código de barras, selecione uma das seguintes opções:

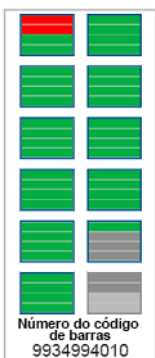
- ▶ Selecione **Rescan** (Voltar a digitalizar). O software tenta digitalizar novamente o código de barras.
- ▶ Selecione o campo de texto e introduza o código de barras numérico conforme apresentado na imagem. Dependendo do BeadChip, os números dos códigos de barras podem ter até 12 dígitos. Selecione **Save** (Guardar). A imagem do código de barras é armazenada na pasta de saída.
- ▶ Selecione **Cancel** (Cancelar). A porta do compartimento de imagiologia abre-se para descarregar o adaptador BeadChip.

Falha na digitalização do BeadChip

As imagens são registadas depois de serem digitalizadas. O registo identifica as esferas ao correlacionar as localizações na imagem digitalizada com as informações fornecidas no mapa de esferas ou na pasta DMAP.

As secções que falharem o registo são indicadas a vermelho na imagem do BeadChip.

Figura 28 BeadChip com a apresentação das secções falhadas



Após a conclusão da digitalização e da gravação dos dados de digitalização na pasta de saída, o botão Rescan (Voltar a digitalizar) fica ativo.

Quando seleciona a opção Rescan (Voltar a digitalizar), o software executa os passos seguintes:

- ▶ Volta a digitalizar as amostras que contêm secções falhadas utilizando uma sobreposição de bloco a bloco aumentada.
- ▶ Gera os ficheiros de saída na pasta de saída original.
- ▶ Substitui os ficheiros de saída anteriores para as secções falhadas.
- ▶ Incrementa o contador de digitalizações em 1 para cada repetição de digitalização, mas executa essa ação em segundo plano. O software não muda o nome da pasta de saída.

Voltar a digitalizar ou iniciar nova digitalização

- 1 Selecione **Rescan** (Voltar a digitalizar) para efetuar a digitalização das amostras que contêm secções falhadas.
- 2 Se a digitalização continuar a falhar, termine-a.

- 3 Remova o BeadChip e o adaptador e inspecione o BeadChip quanto à presença de poeira ou resíduos. Utilize ar comprimido ou outro método de aspiração comprimida para eliminar os resíduos.
- 4 Volte a carregar o BeadChip e inicie uma nova digitalização.
Quando se inicia uma nova digitalização, o software efetua os passos seguintes:
 - ▶ Digitaliza todo o BeadChip.
 - ▶ Gera os ficheiros de saída numa nova pasta de saída.
 - ▶ Incrementa o contador de digitalização em 1 com base na contagem e digitalização da última repetição da digitalização.

Substituição de ficheiros de manifesto e ficheiros de clusters

- 1 Aceda à página de assistência da Illumina (support.illumina.com) para o BeadChip que está a utilizar e clique no separador **Downloads** (Transferências).
- 2 Transfira os ficheiros para serem substituídos ou atualizados e copie os ficheiros para a sua localização preferida na rede.



NOTA

Certifique-se de que seleciona os ficheiros de manifesto e de clusters que são compatíveis com o sistema do instrumento NextSeq 550Dx. Os ficheiros compatíveis incluem **NS550** no nome do ficheiro.

- 3 Apenas se a localização tiver sido alterada, atualize a localização no ecrã BeadChip Scan Configuration (Configuração da digitalização do BeadChip) conforme se segue:
 - a No ecrã Home (Início) do NCS, selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
 - b Selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
 - c Selecione **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da digitalização do BeadChip).
- 4 Selecione **Browse** (Procurar) e navegue até à localização dos ficheiros substituídos ou atualizados.

Receitas personalizadas e pastas de receitas

Não modifique as receitas originais. Efetue sempre uma cópia da receita original com um novo nome. Se modificar uma receita original, o atualizador de software deixa de conseguir reconhecer a receita para atualizações posteriores e as versões mais recentes não são instaladas.

Guarde as receitas personalizadas na pasta de receitas apropriada. As pastas de receitas são organizadas conforme se segue.

- 📁 **Custom** (Personalizadas)
 - 📁 **High** (Elevadas) — Receitas personalizadas utilizadas com um kit de saída elevada.
 - 📁 **Mid** (Intermédias) — Receitas personalizadas utilizadas com um kit de saída intermédia.
- 📁 **High** (Elevadas) — Receitas originais utilizadas com um kit de saída elevada.
- 📁 **Mid** (Intermédias) — Receitas originais utilizadas com um kit de saída intermédia.
- 📁 **Wash** (Lavagem) — Contém a receita de lavagem manual.

Mensagem de erro RAID

O computador do NextSeq 550Dx está equipado com quatro discos rígidos, dois para o modo de diagnóstico e dois para o modo de investigação. Se um disco rígido começar a falhar, o sistema gera uma mensagem de erro RAID e sugere que contacte a Assistência técnica da Illumina. Normalmente, é necessária a substituição do disco rígido.

Pode prosseguir com os passos de configuração do ensaio e funcionamento normal. A finalidade da mensagem é programar a manutenção antecipadamente para evitar interrupções no funcionamento normal do instrumento. Para prosseguir, seleccione **Close** (Fechar).

Configurar as definições do sistema

O sistema é configurado durante a instalação. No entanto, se for necessário efetuar uma alteração ou se o sistema tiver de ser reconfigurado, utilize as opções de configuração do sistema. Apenas uma conta de administrador do Windows tem a permissão para aceder às opções de configuração do sistema.

- ▶ **Network Configuration** (Configuração da rede) — Fornece opções para as definições do endereço IP, endereço do servidor de nomes de domínio (DNS), nome do computador e nome do domínio.
- ▶ **Analysis Configuration** (Configuração da análise) — Fornece opções para os métodos de análise, incluindo BaseSpace, BaseSpace Onsite, modo autónomo e monitorização do ensaio no BaseSpace, bem como definições para um início de sessão predefinido do BaseSpace e comunicação de saúde do instrumento.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da digitalização do BeadChip) — Fornece opções para especificar a localização da pasta DMAP predefinida, a localização da pasta de saída, o formato de ficheiro das imagens guardadas e o tipo de ficheiro de saída.

Definir a configuração da rede

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), seleccione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Seleccione **Network Configuration** (Configuração da rede).
- 3 Seleccione **Obtain an IP address automatically** (Obter um endereço IP automaticamente) para obter o endereço IP utilizando o servidor DHCP.



NOTA

O Protocolo DHCP (Dynamic Host Configuration Protocol) é um protocolo de rede padrão utilizado nas redes IP para distribuir os parâmetros de configuração da rede de forma dinâmica.

Alternativamente, seleccione **Use the following IP address** (Utilizar o seguinte endereço IP) para ligar o instrumento a outro servidor manualmente conforme se segue. Contacte o seu administrador de rede para os endereços específicos à sua instituição.

- ▶ Introduza o endereço IP. O endereço IP é uma série de 4 números separados por um ponto, semelhante a 168.62.20.37, por exemplo.
 - ▶ Introduza a máscara de sub-rede, que é uma subdivisão da rede IP.
 - ▶ Introduza o gateway predefinido, que é o router na rede que liga à Internet.
- 4 Seleccione **Obtain a DNS server address automatically** (Obter automaticamente o endereço do servidor DNS) para ligar o instrumento ao servidor do nome de domínio associado ao endereço IP. Alternativamente, seleccione **Use the following DNS server addresses** (Utilizar os seguintes endereços de servidor DNS) para ligar o instrumento ao servidor do nome de domínio manualmente conforme se segue.
 - ▶ Introduza o endereço DNS preferido. O endereço DNS é o nome do servidor utilizado para traduzir os nomes de domínio para endereços IP.
 - ▶ Introduza o endereço DNS alternativo. O endereço alternativo é utilizado se o DNS preferido não conseguir traduzir um nome de domínio particular para um endereço IP.

- 5 Selecione **Save** (Guardar) para avançar para o ecrã Computer (Computador).



NOTA

O nome do computador do instrumento é atribuído ao computador do instrumento na altura do fabrico. Quaisquer alterações no nome do computador podem afetar a conectividade e exigem um administrador de rede.

- 6 Ligue o computador do instrumento a um domínio ou grupo de trabalho conforme se segue.
 - ▶ **Para os instrumentos ligados à Internet** — Selecione **Member of Domain** (Membro do domínio) e, em seguida, introduza o nome de domínio associado à ligação à Internet na sua instituição. As alterações ao domínio exigem um nome de utilizador e palavra-passe de administrador.
 - ▶ **Para os instrumentos não ligados à Internet** — Selecione **Member of Work Group** (Membro do grupo de trabalho) e, em seguida, introduza um nome do grupo de trabalho. O nome do grupo de trabalho é único à sua instituição.
- 7 Selecione **Save** (Guardar).

Definir a configuração da análise

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Selecione **Analysis Configuration** (Configuração da análise).
- 3 Selecione uma das seguintes opções para especificar uma localização onde os dados são transferidos para análise subsequente.
 - ▶ Selecione **BaseSpace** para enviar os dados de sequenciação para o Illumina BaseSpace. **[Opcional]** Selecione a caixa de verificação **Output Folder** (Pasta de saída), selecione **Browse** (Procurar) e navegue para uma localização secundária na rede para guardar ficheiros BCL para além de os guardar no BaseSpace.
 - ▶ Selecione **BaseSpace Onsite**. No campo Server Name (Nome do servidor), introduza o caminho completo para o seu servidor do BaseSpace Onsite. **[Opcional]** Selecione a caixa de verificação **Output Folder** (Pasta de saída), selecione **Browse** (Procurar) e navegue para uma localização secundária na rede para guardar ficheiros BCL para além de os guardar no servidor do BaseSpace Onsite.
 - ▶ Selecione **Standalone instrument** (Instrumento autónomo) para guardar os dados apenas numa localização na rede. Selecione **Browse** (Procurar) e navegue até um local preferido na rede. O software de controlo gera o nome da pasta de saída automaticamente.
 - ▶ **[Opcional]** Selecione **Use Run Monitoring** (Utilizar a monitorização do ensaio) para monitorizar o ensaio utilizando ferramentas de visualização no BaseSpace. É necessário o início de sessão no BaseSpace e ligação à Internet.
- 4 Se selecionou o BaseSpace ou BaseSpace Onsite, defina os parâmetros do BaseSpace conforme se segue.
 - ▶ Introduza um **User Name** (Nome de utilizador) e **Password** (Palavra-passe) do BaseSpace para registar o instrumento no BaseSpace.
 - ▶ Selecione **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Utilizar o início de sessão predefinido e ignorar o ecrã de início de sessão do BaseSpace) para definir o nome de utilizador e palavra-passe registados como o início de sessão predefinido. Esta definição ignora o ecrã do BaseSpace durante a configuração do ensaio.

- 5 Selecione **Send instrument health information to Illumina** (Enviar dados do estado do instrumento para a Illumina) para ativar o serviço de monitorização proativa da Illumina. O nome da definição na interface do software pode ser diferente no nome neste manual, dependendo da versão do NCS utilizado. Com esta definição ativada, os dados de desempenho do instrumento são enviados para a Illumina. Estes dados ajudam a Illumina a resolver problemas mais facilmente e a detetar potenciais falhas, permitindo uma manutenção proativa e maximizando o tempo de atividade do instrumento. Para mais informações sobre os benefícios deste serviço, consulte a *Nota de proatividade técnica da Illumina (documento N.º 1000000052503)*.

Este serviço:

- ▶ Não envia dados de sequenciação
- ▶ Requer que o instrumento esteja ligado a uma rede com acesso à Internet
- ▶ Exige que o instrumento seja ligado ao BaseSpace



NOTA

Esta opção não está disponível para o BaseSpace Onsite

- ▶ Está ligado por predefinição. Para cancelar este serviço, desative a definição **Send instrument health information to Illumina** (Enviar dados do estado do instrumento para a Illumina).

- 6 Selecione **Save** (Guardar).

Configuração da digitalização do BeadChip

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Selecione **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da digitalização do BeadChip).
- 3 Para especificar uma localização da pasta DMAP predefinida, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até à localização da pasta preferida na rede da sua instituição.



NOTA

Antes de cada digitalização, transfira e copie o conteúdo DMAP para esta localização. O conteúdo DMAP é necessário para cada BeadChip e é único a cada código de barras do BeadChip.

- 4 Para especificar uma localização de saída predefinida, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até à localização preferida na rede da sua instituição.
- 5 Selecione um formato do ficheiro de imagens para as imagens guardadas. O tipo de imagens predefinido é **JPG**.
- 6 Selecione um formato do ficheiro de saída para os dados digitalizados. O tipo de ficheiro de saída predefinido é **GTC only** (Apenas GTC).
- 7 Selecione **Save** (Guardar).
- 8 A partir do ecrã Scan Map (Mapa de digitalização), especifique o caminho total até ao ficheiro de manifesto e ficheiro de cluster para cada tipo de BeadChip. Selecione **Browse** (Procurar) para cada tipo de ficheiro e navegue até à localização da pasta que contém estes ficheiros.
- 9 **[Opcional]** Selecione **Hide Obsolete BeadChips** (Ocultar os BeadChips obsoletos) para remover os BeadChips obsoletos da vista.
- 10 Selecione **Save** (Guardar).

Anexo B Real-Time Analysis

Descrição geral do Real-Time Analysis	57
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	58

Descrição geral do Real-Time Analysis

O instrumento NextSeq 550Dx utiliza uma implementação do software Real-Time Analysis (RTA) designado RTA2. O RTA2 é executado no computador do instrumento e extrai as intensidades das imagens, efetua a identificação de bases e atribui uma pontuação de qualidade à identificação de bases. O RTA2 e o software de controlo comunicam através de uma interface HTTP e ficheiros de memória partilhada. Se o RTA2 terminar, o processamento não é retomado e os dados do ensaio não são guardados.



NOTA

O desempenho de desmultiplexagem não é calculado. Por conseguinte, o separador Index (Indexar) no Sequencing Analysis Viewer (SAV) não é preenchido.

Entradas RTA2

O RTA2 exige as seguintes entradas para o processamento:

- ▶ Imagens em bloco contidas na memória do sistema local.
- ▶ RunInfo.xml, que é gerado automaticamente no início do ensaio e indica o nome do ensaio, o número de ciclos, se uma leitura está indexada e o número de blocos na célula de fluxo.
- ▶ RTA.exe.config, que é o ficheiro de configuração do software no formato XML.

O RTA2 recebe os comandos do software de controlo sobre a localização do ficheiro RunInfo.xml e se é especificada uma pasta de saída opcional.

Ficheiros de saída RTA v2

As imagens para cada canal são transferidas na memória como blocos. Os blocos são pequenas áreas de imagens na célula de fluxo definidos como o campo de visão pela câmara. A partir destas imagens, o software produz o elemento de saída como um conjunto de ficheiros de identificação de bases com a pontuação de qualidade e ficheiros do filtro. Todos os outros ficheiros são ficheiros de saída de suporte.

Tipo de ficheiro	Descrição
Ficheiros de identificação de bases	Cada bloco que é analisado é incluído num ficheiro de identificação de bases agregadas (*.bcl.bgzf) para cada pista e para cada ciclo. O ficheiro de identificação de bases agregadas contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade associada para cada cluster nessa pista.
Ficheiros de filtro	Cada bloco produz informações do filtro que são agregadas em 1 ficheiro de filtro (*.filter) para cada pista. O ficheiro de filtro especifica se um cluster passa pelo filtro.
Ficheiros de localização de clusters	Os ficheiros de localização de clusters (*.locs) contêm as coordenadas X,Y para todos os clusters num bloco. É gerado um ficheiro de localização de clusters para cada pista durante a geração de modelos.
Ficheiros de indexação de identificação de bases	É produzido um ficheiro de indexação de identificação de bases (*.bci) para cada pista para preservar a informação do bloco original. O ficheiro de indexação contém um par de valores para cada bloco, qual é o número do bloco e o número de clusters para esse bloco.

Os ficheiros de saída são utilizados para a análise a jusante no BaseSpace. Alternativamente, utilize o software de conversão bcl2fastq para a conversão FASTQ e soluções de análise de terceiros. Os ficheiros NextSeq 550Dx exigem a versão bcl2fastq v2.0, ou posterior. Para a versão mais recente do bcl2fastq, visite a [página de transferências do NextSeq 550Dx](#) no sítio Web da Illumina.

O RTA v2 fornece métricas em tempo real da qualidade do ensaio armazenadas como ficheiros InterOp. Os ficheiros InterOp são uma saída binária que contém o bloco, ciclo e métricas do nível de leitura, e são necessários para ver as métricas em tempo real utilizando o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para a versão mais recente do SAV, visite a [página de transferências do SAV](#) no sítio Web da Illumina.

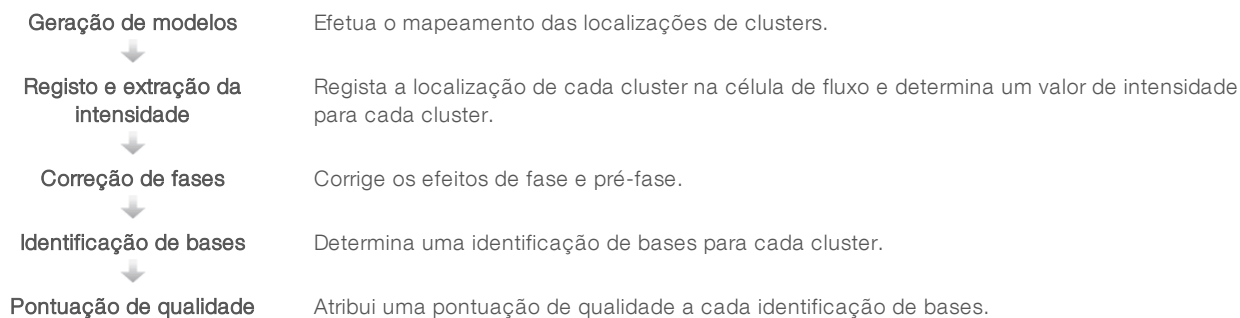
Erro ao manusear

O RTA2 cria ficheiros de registo e grava-os na pasta RTALogs. Os erros são registados num ficheiro de erro no formato de ficheiro *.tsv.

Os seguintes ficheiros de registo e erro são transferidos para o destino de saída final no fim do processamento:

- ▶ O *GlobalLog*.tsv resume os eventos de ensaio importantes.
- ▶ *O Error*.tsv apresenta os erros que ocorreram durante um ensaio.
- ▶ *O WarningLog*.tsv apresenta os avisos que ocorreram durante um ensaio.

Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis



Geração de modelos

O primeiro passo no fluxo de trabalho RTA é a geração de modelos, que define a posição de cada cluster num bloco utilizando as coordenadas X e Y.

A geração de modelos exige dados de imagens dos primeiros 5 ciclos do ensaio. Após a aquisição de imagens do último ciclo de modelos para um bloco, é gerado o modelo.



NOTA

Para detetar um cluster durante a geração de modelos, tem de existir, pelo menos, 1 base diferente de G nos primeiros 5 ciclos. Para quaisquer sequências de indexação, o RTA v2 necessita de, pelo menos, 1 base diferente de G nos primeiros 2 ciclos.

O modelo é utilizado como referência para o passo subsequente de registo e extração da intensidade. As posições dos clusters para toda a célula de fluxo são gravadas nos ficheiros de localização dos clusters (*.locs), 1 ficheiro para cada pista.

Registo e extração da intensidade

O registo e a extração da intensidade começam após a geração de modelos.

- ▶ O registo alinha as imagens produzidas em cada ciclo subsequente de aquisição de imagens em relação ao modelo.
- ▶ A extração de intensidade determina um valor de intensidade para cada cluster no modelo para uma determinada imagem.

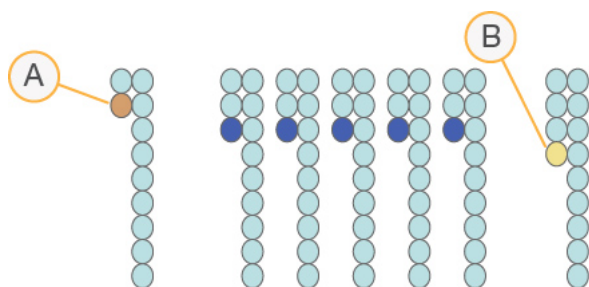
Se o registo falhar para quaisquer imagens num ciclo, não são geradas quaisquer identificações de bases para esse bloco nesse ciclo. Utilize o software Sequencing Analysis Viewer (SAV) para examinar as imagens miniatura e identificar as imagens que falharam no registo.

Correção de fases

Durante a reação de sequenciação, cada cadeia de ADN num cluster estende-se por 1 base por ciclo. A fase e a pré-fase ocorrem quando uma cadeia fica fora de fase com o ciclo atual de incorporação.

- ▶ A fase ocorre quando uma base fica para trás.
- ▶ A pré-fase ocorre quando uma base avança.

Figura 29 Fase e pré-fase



- A Leitura com uma base em fase
- B Leitura com uma base em pré-fase.

O RTA2 corrige os efeitos de fase e pré-fase, o que maximiza a qualidade dos dados em cada ciclo do ensaio.

Identificação de bases

A identificação de bases determina a base (A, C, G ou T) de cada cluster de um determinado bloco num ciclo específico. O instrumento NextSeq 550Dx utiliza a sequenciação de 2 canais, o que exige apenas 2 imagens para codificar os dados para 4 bases de ADN, 1 do canal vermelho e 1 do canal verde.

As intensidades extraídas de uma imagem em comparação com outra imagem resultam em 4 populações distintas, cada uma correspondente a um nucleótido. O processo de identificação de bases determina a que população pertence cada cluster.

Figura 30 Visualização de intensidades de cluster

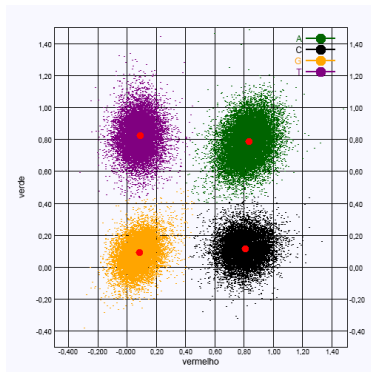


Tabela 1 Identificações de bases na sequenciação de 2 canais

Base	Canal vermelho	Canal verde	Resultado
A	1 (ligado)	1 (ligado)	Clusters que exibem intensidade quer no canal vermelho quer no canal verde.
C	1 (ligado)	0 (desligado)	Clusters que exibem intensidade apenas no canal vermelho.
G	0 (desligado)	0 (desligado)	Clusters que não exibem qualquer intensidade numa localização conhecida do cluster.
T	0 (desligado)	1 (ligado)	Clusters que exibem intensidade apenas no canal verde.

Clusters que passam pelo filtro

Durante o ensaio, o RTA2 filtra os dados em bruto para remover as leituras que não cumprem o limiar de qualidade dos dados. Os clusters sobrepostos e de baixa qualidade são removidos.

Para a análise de 2 canais, o RTA2 utiliza um sistema com base na população para determinar a pureza de uma identificação de bases. Os clusters passam nos filtros (PF) quando no máximo 1 identificação de bases nos primeiros 25 ciclos apresenta uma pureza < 0,63. Os clusters que não passam no filtro não são identificados em termos de bases.

Considerações de indexação

O processo para as leituras de indexação de identificação de bases difere entre as identificações de bases durante outras leituras.

As leituras de indexação têm de iniciar com pelo menos 1 base diferente de G em qualquer um dos 2 primeiros ciclos. Se uma leitura de indexação iniciar com 2 identificações de bases de G, não é gerada nenhuma intensidade do sinal. O sinal tem de estar presente em qualquer um dos 2 primeiros ciclos para garantir a execução da desmultiplexagem.

Para aumentar a robustez de desmultiplexagem, selecione sequências de indexação que forneçam um sinal em pelo menos 1 canal, de preferência em ambos os canais, para todos os ciclos. Seguir esta diretriz evita combinações de indexações que resultam em apenas bases G em qualquer ciclo.

- ▶ Canal vermelho — A ou C
- ▶ Canal verde — A ou T

Este processo de identificação de bases garante a precisão quando se analisam amostras de plexagem baixa.

Pontuação de qualidade

Uma pontuação de qualidade, ou pontuação Q, é uma previsão da probabilidade de uma identificação de bases incorreta. Uma pontuação Q mais elevada implica que a identificação de bases tem uma qualidade mais elevada e há mais probabilidade de estar correta.

A pontuação Q é uma forma compacta de comunicar probabilidades de pequenos erros. As pontuações de qualidade são representadas como Q(X), onde X é a pontuação. A seguinte tabela mostra a relação entre a pontuação de qualidade e a probabilidade de erro.

Pontuação Q - Q(X)	Probabilidade de erro
Q40	0,0001 (1 em 10 000)
Q30	0,001 (1 em 1000)
Q20	0,01 (1 em 100)
Q10	0,1 (1 em 10)



NOTA

A pontuação de qualidade baseia-se numa versão modificada do algoritmo Phred.

A pontuação de qualidade calcula um conjunto de preditores para cada identificação de bases e, em seguida, usa os valores do preditor para verificar a pontuação Q numa tabela de qualidade. As tabelas de qualidade são criadas para fornecer predições de qualidade perfeitamente precisas para ensaios gerados por uma configuração específica da plataforma de sequenciação e versão de química.

Depois de determinar a pontuação de Q, os resultados são registados nos ficheiros de identificação de bases (*.bcl.bgzf).

Anexo C Ficheiros e pastas de saída

Ficheiros de saída da sequenciação	63
Estrutura de pastas de saída de sequenciação	66
Ficheiros de saída da digitalização	67
Estrutura de pastas de saída de digitalização	67

Ficheiros de saída da sequenciação

Tipo de ficheiro	Descrição de ficheiro, localização e nome
Ficheiros de identificação de bases	Cada bloco analisado é incluído num ficheiro de identificação de bases, agregado em 1 ficheiro para cada pista, para cada ciclo. O ficheiro agregado contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade codificada para cada cluster nessa pista. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Os ficheiros são guardados em 1 pasta para cada pista. [Ciclo].bcl.bgzf, onde [Ciclo] representa o número do ciclo em 4 dígitos. Os ficheiros de identificação de bases são comprimidos com a compressão de blocos gzip.
Ficheiro de indexação de bases	Para cada pista, um ficheiro de indexação binário lista as informações originais do bloco num par de valores para cada bloco, que são o número do bloco e o número de clusters para o bloco. Os ficheiros de indexação de identificação de bases são criados da primeira vez que é criado um ficheiro de identificação de bases para essa pista. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Os ficheiros são guardados em 1 pasta para cada pista. s_[Pista].bci
Ficheiros de localização de clusters	Para cada bloco, as coordenadas XY para todos os clusters são agregadas em 1 ficheiro de localização de clusters para cada pista. Os ficheiros de localização de clusters são o resultado da geração de modelos. Data\Intensities\L00[X] — Os ficheiros são guardados em 1 pasta para cada pista. s_[pista].locs
Ficheiros de filtro	O ficheiro de filtro especifica se um cluster passou pelo filtro. As informações do filtro são agregadas em 1 ficheiro de filtro para cada pista e leitura. Os ficheiros de filtro são gerados ao ciclo 26 com 25 ciclos de dados. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Os ficheiros são guardados em 1 pasta para cada pista. s_[pista].filter
Ficheiros InterOp	Ficheiros de comunicação binária utilizados para o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Os ficheiros InterOp são atualizados ao longo do ensaio. Pasta InterOp
Ficheiro de configuração RTA	Criado no início do ensaio, o ficheiro de configuração RTA indica as definições para o ensaio. [Pasta raiz], RTAConfiguration.xml
Ficheiro de informações do ensaio	Indica o nome do ensaio, o número de ciclos em cada leitura, se a leitura é uma leitura indexada e o número de faixas e blocos na célula de fluxo. O ficheiro de informações do ensaio é criado no início do ensaio. [Pasta raiz], RunInfo.xml

Blocos da célula de fluxo

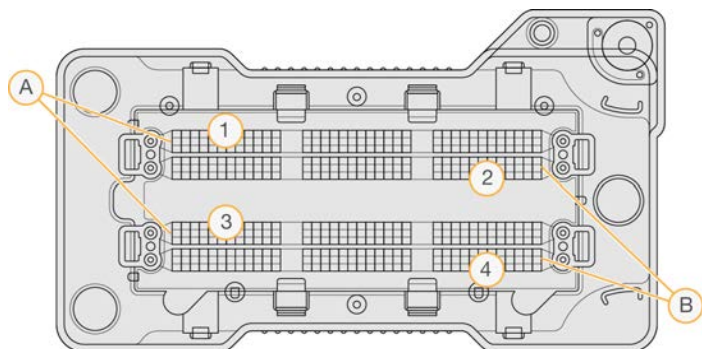
Os blocos são pequenas áreas de imagens na célula de fluxo definidos como o campo de visão pela câmara. O número total de blocos depende do número de pistas, faixas e superfícies cujas imagens são adquiridas na célula de fluxo e como as câmaras trabalham em conjunto para recolher as imagens. As células de fluxo de saída elevada têm um total de 864 blocos.

Tabela 2 Blocos da célula de fluxo

Componente da célula de fluxo	Saída elevada	Descrição
Pistas	4	Uma pista é um canal físico com portas de entrada e saída dedicadas.
Superfícies	2	São obtidas imagens da célula de fluxo em 2 superfícies, a superior e a inferior. É adquirida a imagem da superfície superior de 1 bloco e, em seguida, é adquirida a imagem da superfície inferior do mesmo bloco antes de se mover para o bloco seguinte.
Faixas por pista	3	Uma faixa é uma coluna de blocos numa pista.
Segmentos da câmara	3	O instrumento utiliza 6 câmaras para adquirir imagens da célula de fluxo em 3 segmentos para cada pista.
Blocos por faixa por segmento da câmara	12	Um bloco é a área na célula de fluxo que a câmara visualiza como 1 imagem.
Total de imagens dos blocos	864	O número total de blocos equivale às pistas × superfícies × faixas × segmentos da câmara × blocos por faixa por segmento.

Numeração das pistas

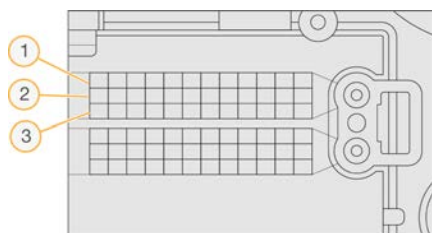
Pistas 1 e 3, designadas par de pistas A: são adquiridas as imagens ao mesmo tempo. Pistas 2 e 4, designadas par de pistas B: são adquiridas as imagens quando a aquisição de imagens do par de pistas A estiver concluída.

Figura 31 Numeração das pistas

- A Par de pistas A — Pistas 1 e 3
- B Par de pistas B — Pistas 2 e 4

Numeração das faixas

São adquiridas as imagens de cada pista em 3 faixas. As faixas são numeradas entre 1 e 3 para as células de fluxo de saída elevada.

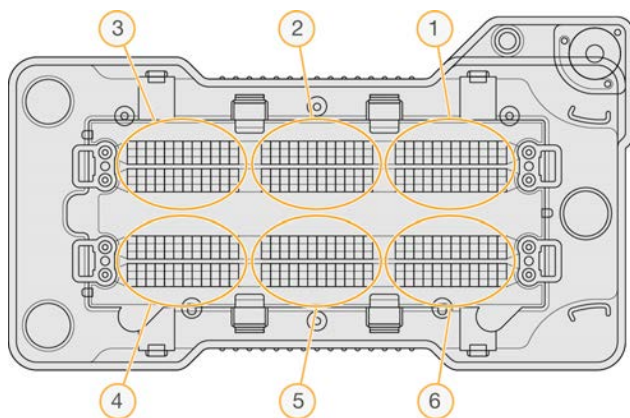
Figura 32 Numeração das faixas

Numeração das câmaras

O instrumento NextSeq 550Dx utiliza 6 câmaras para adquirir imagens da célula de fluxo.

As câmaras são numeradas entre 1 e 6. Pista 1 de imagens das câmaras 1 a 3. Pista 3 de imagens das câmaras 4 a 6. Após a aquisição das imagens das pistas 1 e 3, o módulo de aquisição de imagens move-se no eixo X para as pistas 2 e 4 de imagens.

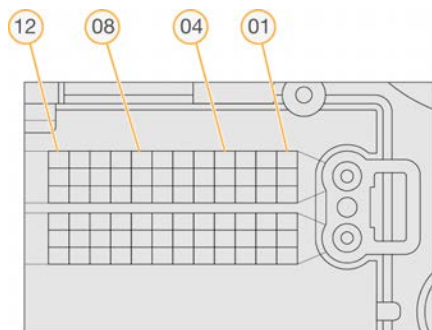
Figura 33 Numeração das câmaras e segmentos (célula de fluxo de saída elevada apresentada)



Numeração dos blocos

Existem 12 blocos em cada faixa de cada segmento da câmara. Os blocos são numerados de 01 a 12, independentemente do número da faixa ou segmento da câmara e são representados em 2 dígitos.

Figura 34 Numeração dos blocos



O número completo do bloco inclui 5 dígitos para representar a localização, conforme se segue:

- ▶ **Superfície** — 1 representa a superfície superior; 2 representa a superfície inferior
- ▶ **Faixa** — 1, 2 ou 3
- ▶ **Câmara** — 1, 2, 3, 4, 5 ou 6
- ▶ **Bloco** — 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 ou 12

Exemplo: O número do bloco 12508 indica a superfície superior, a faixa 2, a câmara 5 e o bloco 8.

O número completo do bloco de 5 dígitos é utilizado no nome do ficheiro das imagens miniatura e ficheiros de fase empírica. Para obter mais informações, consulte *Ficheiros de saída da sequenciação* na página 63.


Estrutura de pastas de saída de sequenciação

O software de controlo gera o nome da pasta de saída automaticamente.

Data (Dados)


Intensities (Intensidades)

BaseCalls (Identificações de bases)

 **L001** — Ficheiros da identificação de bases para a pista 1, agregados em 1 ficheiro por ciclo.

 **L002** — Ficheiros da identificação de bases para a pista 2, agregados em 1 ficheiro por ciclo.

 **L003** — Ficheiros da identificação de bases para a pista 3, agregados em 1 ficheiro por ciclo.

 **L004** — Ficheiros da identificação de bases para a pista 4, agregados em 1 ficheiro por ciclo.

 **L001** — Um ficheiro *.locs agregado para a pista 1.

 **L002** — Um ficheiro *.locs agregado para a pista 2.

 **L003** — Um ficheiro *.locs agregado para a pista 3.

 **L004** — Um ficheiro *.locs agregado para a pista 4.

Images (Imagens)

Focus (Foco)

 **L001** — Imagens focadas para a pista 1.


 **L002** — Imagens focadas para a pista 2.

 **L003** — Imagens focadas para a pista 3.

 **L004** — Imagens focadas para a pista 4.

 **InterOp** — Ficheiros binários utilizados pelo Sequencing Analysis Viewer (SAV).

 **Logs** (Registos) — Ficheiros de registo que descrevem os passos operacionais.

 **Recipe** (Receita) — Ficheiro de receitas específicas do ensaio designado com a ID do cartucho de reagentes.

 **RTALogs** (Registos RTA) — Ficheiros de registo que descrevem os passos de análise.

 RTAConfiguration.txt

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

Ficheiros de saída da digitalização

Tipo de ficheiro	Descrição de ficheiro, localização e nome
Ficheiros GTC	Ficheiro de identificação de génotipos. Um ficheiro GTC é gerado para cada amostra digitalizada no BeadChip. O nome do ficheiro inclui o código de barras e a amostra digitalizada. [código de barras]_[amostra].gtc
Ficheiros de imagens	Os ficheiros de imagens são identificados de acordo com a área digitalizada no BeadChip. O nome inclui o código de barras, a amostra e a secção no BeadChip, a faixa e o canal de aquisição de imagens (vermelho ou verde). [código de barras]_[amostra]_[secção]_[faixa]_[câmara]_[bloco]_[canal].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Código de barras — O nome do ficheiro começa com o código de barras do BeadChip. • Amostra — Uma área do BeadChip, que é numerada como uma fila (R0X), de cima para baixo, e coluna (C0X) da esquerda para a direita. • Secção — Uma fila numerada numa amostra. • Faixa — São adquiridas as imagens de BeadChips como uma coleção de blocos sobrepostos. Por conseguinte, é utilizada apenas 1 faixa para adquirir a imagem da secção. • Câmara — A câmara utilizada para adquirir a imagem. • Bloco — Uma área de aquisição de imagens definida como o campo de visão pela câmara. • Canal — Um canal é vermelho ou verde.

Estrutura de pastas de saída de digitalização

- 📁 [Data]_[Nome do instrumento]_[N.º da digitalização]_[Código de barras]
 - 📁 [Código de barras]
 - 📁 Config
 - 📄 Effective.cfg — Definições de configuração dos registos utilizadas durante a digitalização.
 - 📁 Focus (Foco) — Contém ficheiros de imagens utilizados para focar a digitalização.
 - 📁 Logs (Registos) — Contém os ficheiros de registo que enumeram cada passo executado durante a digitalização.
 - 📁 PreScanDiagnosticFiles (Ficheiros de diagnóstico pré-digitalização)
 - 📁 [Data_Hora] Barcode Scan (Digitalização de código de barras)
 - 📄 ProcessedBarcode.jpg — Imagem do código de barras do BeadChip.
 - 📄 Diagnóstico de digitalização (ficheiros de registo)
 - 📄 PreScanChecks.csv — Resultados dos registos da verificação automática.
 - 📄 Ficheiros GTC — Ficheiros de identificação de génotipos (1 ficheiro por amostra).
 - 📄 Ficheiros IDAT — [Opcionais] Ficheiros de dados de intensidade (2 ficheiros por amostra; 1 cada por canal).
 - 📄 Ficheiros de imagens — Imagens digitalizadas para cada amostra, secção, faixa, câmara, bloco e canal.
 - 📄 [Código de barras]_amostra_métricas.csv
 - 📄 [Código de barras]_secção_métricas.csv
 - 📄 ScanParameters.xml

Índice remissivo

A

- adaptador
 - carregamento do BeadChip 33
 - descrição geral 6
 - orientação do BeadChip 31
- ajuda
 - documentação 2
- ajuda técnica 73
- alertas de estado 4
- algoritmo Phred 61
- análise
 - ficheiros de saída 63
- análise, primária
 - pureza do sinal 60
- apoio ao cliente 73
- assistência técnica 73
- áudio 13

B

- barra de estado 3
- BaseSpace 1, 54
 - ícones de transferência 26
 - início de sessão 18
- BeadChip
 - adaptador 6, 31
 - análise 1
 - carregamento 33
 - falha no registo 51
 - não é possível digitalizar o código de barras 51
 - orientação do código de barras 31
 - tipos 1
- botão de alimentação 5, 11

C

- cartucho de reagentes
 - descrição geral 8
 - reservatório n.º 28 38
- cartucho de tampão 9, 21
- célula de fluxo
 - aquisição de imagens 65
 - blocos 63
 - descrição geral 7
 - embalagem 17
 - limpeza 17
 - numeração das pistas 64

- numeração do blocos 65
- número da faixa 64
- pares de pistas 7
- pinos de alinhamento 18
- rehibridação 49
- tipos 1
- ciclos de densidade de clusters 26
- ciclos numa leitura 15-16
- clusters que passam pelo filtro 60
- compartimento de aquisição de imagens 3
- compartimento de reagentes 3
- compartimento de tampão 3
- compatibilidade
 - célula de fluxo, cartucho de reagentes 6
 - controlo RFID 6, 8
- componentes
 - barra de estado 3
 - compartimento de aquisição de imagens 3
 - compartimento de reagentes 3
 - compartimento de tampão 3
- comprimento da leitura 16
- comprimento de leitura 15-16
- Configuração 54
- configuração autónoma 24
- configuração BaseSpace 23
- configuração do ensaio, opção avançada 13
- considerações de indexação 60
- consumíveis 6
 - água laboratorial 14
 - cartucho de reagentes 8
 - cartucho de tampão 9
 - célula de fluxo 7
 - ensaio de sequenciação 14
 - lavar consumíveis 37-38
 - manutenção do instrumento 14
- consumíveis fornecidos pelo utilizador 14
- controlo RFID 6

D

- Decode File Client 29
 - aceder por BeadChip 31
 - aceder por conta 30
- definições de configuração 53
- definições do sistema 12
- diretrizes de água laboratorial 14
- documentação 2, 73
- duração do ensaio 15-16

E

- encerrar o instrumento 43
- erros de verificação pré-ensaio 46
- erros e avisos 4
 - nos ficheiros de saída 58

F

- fase, pré-fase
 - fase empírica 59
- ficheiros de clusters 52
- ficheiros de entrada, digitalizar 52
 - ficheiros de clusters 29
 - ficheiros de manifesto 29, 52
 - pasta DMAP 29
 - pasta DMAP, transferir 30
- ficheiros de filtros 63
- ficheiros de identificação de bases 63
- ficheiros de registo
 - GlobalLog 58
 - LaneNLog 58
- ficheiros de saída 63
- ficheiros de saída da digitalização
 - GTC, IDAT 67
- ficheiros de saída, digitalização
 - GTC, IDAT 67
- ficheiros de saída, sequenciação 63
- ficheiros GTC 67
- ficheiros InterOp 45, 63
- ficheiros locs 63
- filtro de ar 4, 40
- filtro de pureza 60
- fluxo de trabalho
 - BeadChip 33
 - cartucho de reagente 21
 - cartucho de tampão 21
 - célula de fluxo 18
 - considerações de indexação 60
 - descrição geral 16, 30
 - duração do ensaio 15-16
 - hipoclorito de sódio 38
 - início de sessão do BaseSpace 18
 - métricas do ensaio 25
 - modo autónomo 24
 - modo BaseSpace 23
 - opção de carregamento avançado 13
 - preparação da célula de fluxo 17
 - reagentes gastos 20
 - sequenciação 58

- verificação pré-ensaio 25, 33
- fluxo de trabalho de sequenciação 58
- formação online 2
- formamida, posição 6 23

G

- geração de clusters 15, 26
- geração de modelos 58-59
- gerir instrumento
 - encerrar 43

H

- hipoclorito de sódio, lavagem 38

I

- ícones
 - erros e avisos 4
 - estado 4
- identificação de bases 59
 - considerações de indexação 60
- imagiologia, sequenciação de 2 canais 59
- instrumento
 - alunha 12
 - arranque 11
 - avatar 12
 - botão de alimentação 5
 - definições de configuração 53
 - encerrar 43
 - indicadores de modo 12
 - reinicializar 43
 - reiniciar 43
- intensidades 59
- interruptor de alimentação 11

L

- lavagem
 - automática 27
 - consumíveis fornecidos pelo utilizador 37
 - lavagem manual 37
 - lavar componentes 37
- lavagem do instrumento 37
- lavagem pós-ensaio 27
- localização da pasta 24
- localização de clusters 58
 - ficheiros 63

M

- manutenção do instrumento
 - consumíveis 14
- manutenção preventiva 37
- manutenção, preventiva 37
- mensagem de erro RAID 52
- métrica
 - identificação de bases 59
- métricas 26
 - ciclos de intensidade 26
- métricas do ensaio 25
- modo RUO 12

N

- nome de utilizador e palavra-passe 11
- nome de utilizador e palavra-passe do sistema 11
- numeração das câmaras 65
- numeração das faixas 64
- numeração das pistas 64
- numeração dos blocos 65

O

- opção de carregamento avançado 13

P

- parâmetros do ensaio
 - editar parâmetros 23
 - modo autónomo 24
 - modo BaseSpace 23
- pares de pistas 64
- passagem pelo filtro (PF) 60
- pasta DMAP
 - Decode File Client 29
 - transferir 30
- pontuações de Q 61
- probabilidade de erro 61
- purgar os consumíveis 13

R

- reagentes
 - eliminação correta 21
 - em kits 6

- reagentes gastos
 - eliminação 20, 39
 - recipiente cheio 48
- rehibridação de primer 49
- rehibridação, Leitura 1
 - resolução de problemas
 - métricas de baixa qualidade 49
- reinicializar
 - instrumento 43
- reinicializar para o modo de investigação 12
- reiniciar 43
- resolução de problemas
 - falha no registo da digitalização 51
 - ficheiros específicos da digitalização 46
 - ficheiros específicos do ensaio 45
 - não é possível digitalizar o código de barras do BeadChip 51
 - opções de contacto 45
 - recipiente de reagentes gastos 48
 - substituição dos ficheiros de manifesto e de clusters 52
 - verificação pré-ensaio 46
- RTA2
 - erro ao manusear 58
- RunInfo.xml 45, 63

S

- sequenciação
 - consumíveis fornecidos pelo utilizador 14
 - introdução 15
- serviço de cópia do ensaio 26
- serviço de monitorização proativa do Illumina 54
- software
 - análise de imagens, identificação de bases 4
 - atualização automática 42
 - atualização manual 42
 - definições de configuração 53
 - duração do ensaio 15-16
 - inicialização 11
 - no instrumento 4
 - software BlueFuse Multi 1
 - software de atualização 41
 - software de controlo 4
 - software Real-Time Analysis 1, 4
 - fase 59
 - fluxo de trabalho 58
 - resultados 63

T

- teclado 13
- transferência de dados
 - digitalização dos dados 35
 - ícones de atividade 26
 - serviço de cópia do ensaio 26

V

- verificação pré-ensaio 25, 33

W

- Windows
 - sair 43

Assistência técnica

Para obter assistência técnica, contacte o Suporte Técnico da Illumina.

Sítio Web: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Números de telefone do Apoio ao Cliente da Illumina

Região	Número gratuito	Regional
América do Norte	+1.800.809.4566	
Alemanha	+49 8001014940	+49 8938035677
Austrália	+1.800.775.688	
Áustria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
Espanha	+34 911899417	+34 800300143
Finlândia	+358 800918363	+358 974790110
França	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Itália	+39 800985513	+39 236003759
Japão	0800.111.5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nova Zelândia	0800.451.650	
Países Baixos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapura	+1.800.579.2745	
Suécia	+46 850619671	+46 200883979
Suíça	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	00806651752	
Outros países	+44.1799.534000	

Fichas de dados de segurança (FDS) — Disponíveis no sítio Web da Illumina em support.illumina.com/sds.html.

Documentação do produto — Disponível para transferência em PDF a partir do sítio Web da Illumina. Aceda a support.illumina.com, selecione um produto e, em seguida, selecione **Documentation & Literature** (Documentação e literatura).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 EUA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

**Apenas para efeitos de investigação.
Não se destina a utilização em procedimentos de diagnóstico.**

© 2018 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]