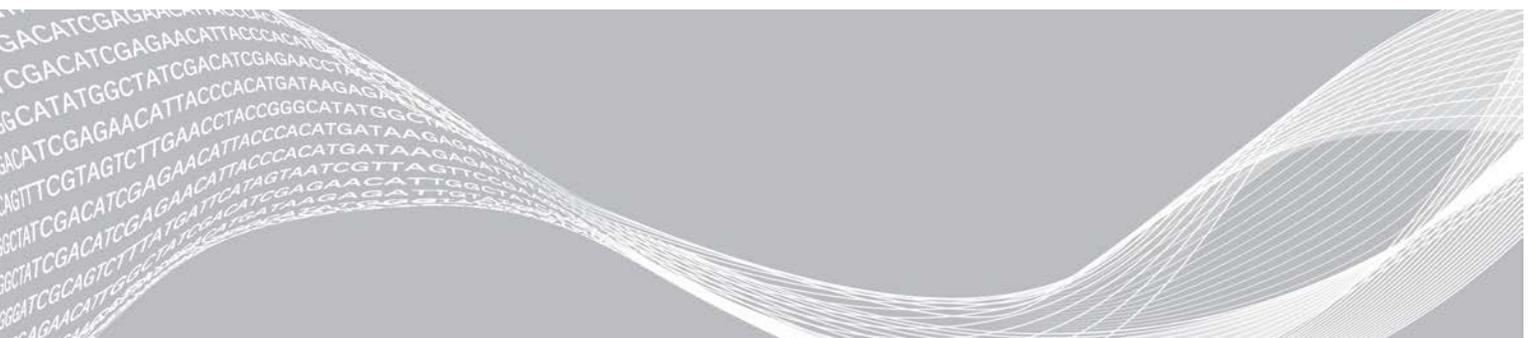


# NextSeq 500

## Guia do sistema



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).

© 2021 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v07	Outubro de 2021	Incluíram-se 3 filtros de ar sobresselentes na secção Substituição do filtro de ar Incluíram-se cartuchos novos e antigos no manual
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v06	Junho de 2019	Adicionaram-se informações do grupo de trabalho para o BaseSpace Sequence Hub durante a configuração do ensaio. Adicionaram-se informações do caminho de UNC para a pasta de saída. Adicionou-se a resolução de problemas para erros de armazenamento de rede. Esclareceram-se as indicações do filtro de ar para instrumentos com um filtro de ar acessível a partir do painel posterior. Atualizou-se a localização dos ficheiros que se encontravam na pasta raiz para pastas específicas do ensaio da pasta de saída.
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v05	Dezembro de 2018	Atualizaram-se as descrições do software, ecrãs e fluxo de trabalho do NextSeq Control Software (NCS) 4.0. Atualizaram-se as seguintes informações adicionais sobre o NCS 4.0. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionaram-se informações sobre o software Local Run Manager.</li> <li>• Atualizaram-se informações do BaseSpace para o BaseSpace Sequence Hub. O separador BaseSpace Prep e o BaseSpace Onsite já não se encontram disponíveis.</li> <li>• Adicionaram-se instruções sobre a secção do modo de ensaio manual ou Local Run Manager. O modo manual substitui o modo autónomo com algumas modificações.</li> <li>• Adicionou-se a opção para verificar a existência de atualizações de software do instrumento no BaseSpace Sequence Hub.</li> <li>• Adicionou-se a unidade do Direct Memory Access, Local Run Manager e Universal Copy Service à descrição do Pacote do sistema. Removeu-se o BaseSpace Broker e o SAV.</li> <li>• O Run Copy Service é agora o Universal Copy Service.</li> <li>• Adicionou-se uma opção para ativar as receitas personalizadas ao carregar o cartucho de reagentes.</li> <li>• Removeu-se a descrição da imagem da célula de fluxo durante a monitorização do progresso do ensaio.</li> <li>• Removeu-se a opção de selecionar arranque no modo Windows e de quiosque.</li> <li>• Adicionaram-se instruções de manutenção para instrumentos com uma atualização do filtro de ar.</li> <li>• Adicionaram-se ícones para atenção, informação e minimizar NCS.</li> <li>• Atualizaram-se as instruções de personalização das definições do ensaio e do sistema.</li> <li>• Atualizou-se a opção de enviar dados de desempenho do instrumento.</li> <li>• Atualizaram-se os ícones de transferência de dados.</li> <li>• Esclareceu-se que, para a análise, os ficheiros em fila de espera para transferência não têm limite de tempo.</li> <li>• Corrigiram-se as referências a BSM para Buffer Straw Mechanism nas informações das verificações de movimento.</li> </ul> Adicionou-se reagente ou metanol de grau espectrofotométrico ou álcool isopropílico (99%) para a manutenção de instrumentos.

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v04	Maio de 2018	Adicionou-se suporte para reagentes NextSeq v2.5. Atualizaram-se as informações de armazenamento/envio de NextSeq v2.5 Reagent Kits de envio de células de fluxo a temperaturas ambiente. As condições de armazenamento anterior continuam a aplicar-se às células de fluxo do NextSeq v2.5. Adicionaram-se informações sobre os NextSeq v2.5 Reagent Kits que requerem atualizações de software para a versão 2.2. Adicionou-se uma nota relacionada com a concentração de carregamento do kit de saída intermédia. Adicionou-se uma nota sobre guardar células de fluxo. Adicionou-se uma nota que recomenda a utilização de células de fluxo de saída elevada para as verificações do sistema.
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v03	Março de 2018	Removeu-se o nome de utilizador predefinido e a palavra-passe necessários para iniciar sessão no sistema operativo. A Illumina recomenda a utilização de credenciais específicas do centro. Adicionaram-se informações sobre o serviço de monitorização Illumina Proactive na secção Selecionar configuração do BaseSpace. Atualizaram-se as referências a RTA v2 para RTA2.
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v02	Março de 2016	Adicionou-se uma secção com o título Considerações de indexação. Removeram-se passos de inspeção da célula de fluxo. Especificou-se a concentração e o volume de carregamento no passo Load Libraries onto the Reagent Cartridge (Carregar bibliotecas no cartucho de reagentes).
Material n.º 20001879 Documento n.º 15046563 v01	Outubro de 2015	Especificou-se que um equivalente ao fornecedor recomendado de NaOCl é um equivalente de grau laboratorial. Adicionou-se uma recomendação de serviço de manutenção preventiva anual. Reorganizou-se a informação nos capítulos Descrição geral e Primeiros passos. Adicionaram-se instruções de personalização das definições do sistema. Removeram-se as instruções de ajuda em direto do capítulo de resolução de problemas. Esta funcionalidade foi removida do software de controlo.
N.º da peça 15046563 Rev. I	Maio de 2015	Corrigiu-se a descrição dos reservatórios reservados no cartucho de reagentes.
N.º da peça 15046563 Rev. H	Maio de 2015	Corrigiu-se o volume do Tween 20 na solução de lavagem utilizada para lavagens manuais. Reestruturaram-se as informações sobre as opções de configuração do sistema. Moveram-se informações sobre o software Real-Time Analysis para o Anexo A.

Documento	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15046563 Rev. G	Fevereiro de 2015	<p>Atualizaram-se as descrições do NextSeq Control Software v1.4.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionaram-se as opções de lavagem manual: lavagem rápida e lavagem manual pós-ensaio.</li> <li>• Adicionou-se uma descrição das funcionalidades de personalização dos ensaios para purgar consumíveis no final do ensaio e para ignorar a confirmação da verificação pré-ensaio.</li> <li>• Adicionou-se a opção para cancelar e reiniciar uma verificação pré-ensaio.</li> <li>• Adicionou-se a opção para ativar a monitorização do ensaio no modo autónomo.</li> <li>• Removeu-se a descrição dos ficheiros de desvio e de faseamento, que já não são gravados na pasta do ensaio.</li> <li>• Atualizou-se a imagem do gráfico para apresentar identificações de bases distribuídas de forma mais uniforme quando se utiliza a versão 1.4 do software do sistema.</li> <li>• Adicionou-se uma descrição do Run Copy Service.</li> <li>• Adicionou-se a opção de utilizar um primer de Índice 2 personalizado, o que é possível com o NextSeq 500 Kit v2. Para mais informações, consulte o <i>NextSeq Custom Primers Guide (Guia de primers personalizados do NextSeq) (documento n.º 15057456)</i>.</li> </ul> <p>Atualizaram-se as instruções de preparação para utilizar o NextSeq 500 Kit v2: removeram-se os passos manuais de carregamento de primers de indexação dupla e hipoclorito de sódio no cartucho de reagentes. Estes reagentes estão previamente cheios no cartucho de reagentes v2. Para mais informações, consulte o <i>NextSeq 500/550 Kit v2 Reference Guide (Guia de referência do NextSeq 500/550 Kit v2) (documento n.º 15058065)</i>.</p> <p>Adicionou-se a secção de consumíveis de sequenciação que lista versões do kit, versões do NCS compatíveis e o nome e o número da peça do guia de referência do kit associado.</p> <p>Atualizaram-se os consumíveis fornecidos pelo utilizador de modo a especificar as utilizações de NaOCl para as opções de lavagem manual introduzidas no NCS v1.4.</p> <p>Corrigiram-se os requisitos para os clusters que passam pelo filtro para não mais do que uma identificação de bases abaixo da pureza nos primeiros 25 ciclos.</p> <p>Adicionou-se o volume de 120 ml de água laboratorial às instruções de verificação do sistema.</p>
N.º da peça 15046563 Rev. F	Setembro de 2014	<p>Corrigiram-se as descrições de funcionalidades do NextSeq Control Software v1.3.</p> <p>URL atualizado para fichas de dados de segurança (SDS) para <a href="http://support.illumina.com/sds.html">support.illumina.com/sds.html</a>.</p> <p>Atualizaram-se as marcações do produto NextSeq de ™ para ®.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15046563 Rev. E	Agosto de 2014	<p>Atualizaram-se as descrições do NextSeq Control Software v1.3:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atualizaram-se as descrições dos comandos de personalização do sistema e atualizações de software no ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento).</li> <li>• Atualizou-se a descrição do ecrã Pre-Run Check (Verificação pré-ensaio), o qual agrupa os itens verificados em quatro categorias expansíveis.</li> <li>• Atualizaram-se as instruções de ajuda em direto para aceder à mesma utilizando o URL. O ícone no ecrã inicial não está disponível no NCS v1.3.</li> <li>• Adicionou-se o procedimento de rehibridização no instrumento para a rehibridização do primer de Leitura 1. A opção de rehibridizar uma célula de fluxo é compatível com o NCS v1.3, ou uma versão posterior, e requer um novo cartucho de reagentes e cartucho de tampão.</li> </ul> <p>Adicionou-se o <i>NextSeq Custom Primers Guide (Guia de primers personalizados do NextSeq)</i> (documento n.º 15057456) de modo a listar recursos adicionais.</p>
N.º da peça 15046563 Rev. D	Junho de 2014	<p>Adicionaram-se instruções de carregamento de BP13 na posição n.º 18 do cartucho de reagentes durante a realização de ensaios de índice duplo.</p> <p>Corrigiu-se o ciclo durante o qual as métricas da densidade de clusters aparecem, ou seja, o ciclo 25.</p> <p>Corrigiram-se as posições do cartucho de reagentes dos primers personalizados para posição n.º 7 (leitura 1), n.º 8 (leitura 2) e n.º 9 (índice 1).</p> <p>Adicionou-se uma nota sobre os potenciais danos de deslocar o instrumento após a instalação. Contacte sempre o seu representante da Illumina antes de deslocar o instrumento.</p> <p>URL atualizado para fichas de dados de segurança (SDS) para <a href="http://support.illumina.com/sds.ilmn">support.illumina.com/sds.ilmn</a>.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15046563 Rev. C	Abril de 2014	<p>Atualizaram-se as descrições do NextSeq Control Software v1.2 e RTA v2.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionou-se o nome da receita NextSeq Mid (NextSeq intermédia) para utilização com o NextSeq 500 Mid Output Kit.</li> <li>• Removeram-se as instruções para adicionar NaOCl ao cartucho de lavagem de tampão para uma lavagem manual.</li> <li>• Corrigiu-se o volume NaOCl para 3 ml para a posição 28 do cartucho de reagentes, o que é necessário para a lavagem automática pós-ensaio.</li> <li>• Indicou-se que os nomes de ensaios longos aparecem num campo de deslocamento no ecrã Run Setup (Configuração do ensaio).</li> <li>• Indicou-se que o RTA v2 não aplica correções de faseamento e pré-faseamento às leituras de índice.</li> <li>• Adicionou-se uma descrição dos ficheiros de registo à lista de ficheiros utilizados para resolução de problemas.</li> <li>• Adicionaram-se instruções para esvaziar um recipiente de reagentes gastos cheio durante um ensaio.</li> <li>• Adicionou-se uma descrição das pastas de receitas, incluindo a localização de receitas personalizadas.</li> <li>• Adicionou-se uma descrição das verificações térmicas das ventoinhas e sondas térmicas.</li> </ul>
N.º da peça 15046563 Rev. B	Fevereiro de 2014	<p>Atualizaram-se as descrições do NextSeq Control Software v1.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionou-se a funcionalidade de pesquisa no ecrã Run Setup (Configuração do ensaio) para filtrar a lista de ensaios disponíveis.</li> <li>• Adicionou-se o facto de as receitas disponíveis incluírem o NextSeq High (NextSeq elevada) ou o NextSeq Mid (NextSeq intermédia), dependendo do tipo de célula de fluxo.</li> <li>• Indicou-se que as atualizações de software incluem o contrato de licença, as notas de lançamento e uma lista do software a atualizar.</li> <li>• Adicionou-se a descrição da mensagem de erro RAID.</li> <li>• Indicou-se que um botão Exit (Sair) fecha o NSS e reinicia o NCS automaticamente no final de uma verificação do sistema.</li> </ul> <p>Adicionou-se a duração de armazenamento de reagentes de até uma semana a 4 °C.</p> <p>Atualizou-se a etiqueta do cartucho de reagentes do reservatório n.º 10 para Load Library Here (Carregar biblioteca aqui).</p> <p>Atualizou-se a lista de consumíveis fornecidos pelo utilizador para especificar hipoclorito de sódio a 3%–6% e listar um número de catálogo do fornecedor.</p> <p>Atualizaram-se as instruções de preparação de uma diluição de 0,06% de NaOCl para lavagens de instrumentos, o que inclui uma redução no volume para 2 ml e uma concentração inicial de 3%–6%.</p> <p>Adicionaram-se ilustrações para apresentar a posição correta e incorreta do grampo na célula de fluxo.</p> <p>Atualizou-se o capítulo do Real-Time Analysis de modo a incluir uma descrição geral do RTA v2, a estrutura de pastas de saída e o processo de identificação de bases.</p> <p>Atualizou-se o capítulo de resolução de problemas de modo a incluir erros do RTA v2 e a incluir o RunParameters.xml na lista de ficheiros de resolução de problemas.</p>
N.º da peça 15046563 Rev. A	Janeiro de 2014	Edição inicial.

# Índice

Capítulo 1 Descrição geral .....	1
Introdução .....	1
Recursos adicionais .....	1
Componentes do instrumento .....	2
Descrição geral dos consumíveis de sequenciação .....	5
Capítulo 2 Primeiros passos .....	10
Ligar o instrumento .....	10
Personalizar as definições do sistema .....	11
Personalizar definições do ensaio .....	12
Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador .....	13
Capítulo 3 Sequenciação .....	15
Introdução .....	15
Criar ensaio com o Local Run Manager Software .....	16
Criar ensaio com o NCS .....	16
Preparar o cartucho de reagentes .....	16
Preparar a célula de fluxo .....	17
Preparar bibliotecas para sequenciação .....	18
Configurar um ensaio de sequenciação .....	18
Monitorizar o progresso do ensaio .....	25
Lavagem automática pós-ensaio .....	27
Capítulo 4 Manutenção .....	28
Introdução .....	28
Realizar uma lavagem manual .....	28
Substituição do filtro de ar .....	31
Atualizações de software .....	32
Encerrar o instrumento .....	34
Anexo A Resolução de problemas .....	35
Introdução .....	35
Ficheiros de resolução de problemas .....	35
Resolver erros de verificação automática .....	36
O recipiente de reagentes gastos está cheio .....	37
Fluxo de trabalho de rehibridização .....	37
Receitas personalizadas e pastas de receitas .....	40
Verificação do sistema .....	40
Mensagem de erro RAID .....	42
Erro de armazenamento de rede .....	42
Configurar as definições do sistema .....	43
Anexo B Real-Time Analysis .....	46

Descrição geral do Real-Time Analysis .....	46
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis .....	47
Ficheiros de saída da sequenciação .....	51
Blocos da célula de fluxo .....	51
Estrutura da pasta de saída .....	55
Index .....	56
Assistência técnica .....	59

# Capítulo 1 Descrição geral

Introdução .....	1
Recursos adicionais .....	1
Componentes do instrumento .....	2
Descrição geral dos consumíveis de sequenciação .....	5

## Introdução

O sistema Illumina® NextSeq™ 500 combina o poder da sequenciação de elevada produtividade e a simplicidade dos instrumentos de sequenciação de secretária.

## Caraterísticas

- ▶ **Sequenciação de elevada produtividade** — O NextSeq 500 permite a sequenciação de exomas, genomas completos e transcriptomas e suporta bibliotecas TruSeq™, TruSight™ 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 utiliza uma implementação do RTA designada RTA v2, que inclui importantes diferenças na arquitetura e funcionalidades. Para mais informações, consulte *Real-Time Analysis* na página 46.
- ▶ **Análise baseada na nuvem com o BaseSpace™ Sequence Hub** — O fluxo de trabalho de sequenciação está integrado no BaseSpace Sequence Hub, o ambiente de informática na nuvem genómica da Illumina para monitorização do ensaio, análise de dados, armazenamento e colaboração. À medida que o ensaio avança, os ficheiros de saída são transmitidos em tempo real para o BaseSpace Sequence Hub para análise.
- ▶ **Análise dos dados no instrumento** — O software Local Run Manager analisa os dados do ensaio de acordo com o módulo de análise especificado para o ensaio.

## Recursos adicionais

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

Recurso	Descrição
<i>NextSeq System Site Prep Guide (Guia de preparação do centro clínico para o sistema NextSeq) (documento n.º 15045113)</i>	Fornece as especificações para o espaço laboratorial, os requisitos elétricos e as considerações ambientais.
<i>NextSeq System Safety and Compliance Guide (Guia de segurança e conformidade do sistema NextSeq) (documento n.º 15046564)</i>	Fornece informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e etiquetas do instrumento.
<i>RFID Reader - Model # TR-001-44 User Guide (Guia de utilizador do leitor RFID — Modelo n.º TR-001-44) (documento n.º 15041950)</i>	Fornece informações sobre o leitor RFID no instrumento, certificações de conformidade e considerações de segurança.

Recurso	Descrição
<i>Denaturing and Diluting Libraries for the NextSeq System (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>NextSeq Custom Primers Guide (Guia 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</i>	Fornecer informações sobre a utilização do BaseSpace™ Sequence Hub e as opções de análise disponíveis.
<i>Local Run Manager Software Guide (Guia do software Local Run Manager) (documento n.º 100000002702)</i>	Fornecer uma descrição geral do software Local Run Manager e instruções de utilização de funcionalidades do software.

Visite a [página de suporte do NextSeq 500](#) no sítio Web da Illumina para aceder a documentação, transferências de software, formações online e perguntas frequentes.

## Componentes do instrumento

O sistema NextSeq 500 inclui um monitor com ecrã tátil, uma barra de estado e quatro compartimentos.

**Figura 1** Componentes do instrumento



- A **Monitor com ecrã tátil** — Permite a configuração no instrumento e a preparação utilizando a interface do software de controlo.
- B **Barra de estado** — Indica o estado do instrumento como em processamento (azul), necessita de atenção (laranja), pronto para sequenciar (verde) ou quando é necessário concluir uma lavagem nas 24 horas seguintes (amarelo).
- C **Compartimento de tampão** — Inclui o cartucho de tampão e o recipiente de reagentes gastos.
- D **Compartimento de reagentes** — Inclui o cartucho de reagentes.
- E **Botão de alimentação** — Liga ou desliga o instrumento e o computador do instrumento.
- F **Compartimento de aquisição de imagens** — Inclui a célula de fluxo durante um ensaio de sequenciação.
- G **Compartimento do filtro de ar** — Inclui o filtro de ar para instrumentos com um filtro acessível a partir do painel posterior.

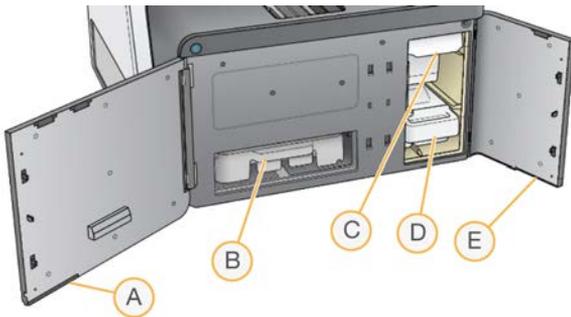
## Compartimento de aquisição de imagens

O compartimento de aquisição de imagens inclui o estrado, que inclui três pinos de alinhamento para posicionar a célula de fluxo. Depois de carregar a célula de fluxo, 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 NextSeq 500 requer 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 do canto inferior direito da porta. O compartimento de reagentes inclui o cartucho de reagentes. Os reagentes são bombeados através das unidades de aspiração e do sistema de fluidicos e, em seguida, para a célula de fluxo.
- 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 para instrumentos com um filtro acessível a partir do painel posterior. Substitua o filtro de ar a cada 90 dias. Para obter informações sobre a substituição do filtro, consulte *Substituição do filtro de ar* na página 31.

## NextSeq Software

O software do instrumento inclui aplicações integradas que realizam ensaios de sequenciação.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** — Controla o funcionamento do instrumento e orienta o utilizador passo a passo na configuração de um ensaio de sequenciação.
  - ▶ O software é previamente instalado no NextSeq e é executado no instrumento. O NCS executa o ensaio de acordo com os parâmetros especificados no módulo do software Local Run Manager ou no NCS.

- ▶ Antes de iniciar um ensaio de sequenciação, o utilizador seleciona um ensaio que criou com o módulo do Local Run Manager ou no NCS. A interface do software NCS orienta-o ao longo dos passos necessários para carregar a célula de fluxo e os reagentes.
- ▶ Durante o ensaio, o software opera o estrado da célula de fluxo, distribui os reagentes, controla os fluidos, define as temperaturas, captura imagens dos clusters na célula de fluxo e fornece um resumo visual das estatísticas de qualidade. Pode monitorizar o ensaio no NCS ou no Local Run Manager.
- ▶ Durante o ensaio, o qual pode monitorizar no NCS ou no Local Run Manager, o NCS realiza as funções que se seguem.
  - ▶ Opera o estrado da célula de fluxo
  - ▶ Distribui reagentes
  - ▶ Controla fluidos
  - ▶ Define temperaturas
  - ▶ Captura imagens de clusters na célula de fluxo
  - ▶ Fornece um resumo visual das estatísticas de qualidade
- ▶ **Local Run Manager Software** — Solução de software integrada para criar um ensaio e analisar os resultados (análise secundária). O software também permite monitorizar as amostras e controlar as permissões do utilizador.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA) Software** — O RTA executa uma análise de imagem e de identificação de bases durante o ensaio. O NextSeq 500 utiliza o RTA v2, que inclui importantes diferenças na arquitetura e funcionalidades em relação às versões anteriores. Para mais informações, consulte [Real-Time Analysis na página 46](#).
- ▶ **Universal Copy Service** — Copia os ficheiros de sequenciação de saída da pasta do ensaio para a pasta de saída e para o BaseSpace Sequence Hub (se aplicável), onde pode aceder aos mesmos.

O Real-Time Analysis (RTA) e o Universal Copy Service executam apenas processos em segundo plano.

## Ícones de estado

Um ícone de estado no canto superior direito do ecrã da interface do software de 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.
	Atenção	Ocorreu uma notificação que exige a atenção. Consulte a mensagem para obter informações adicionais.
	Informações	Apenas uma mensagem adicional. Não é necessária nenhuma ação adicional.

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.

## Ícone da barra de navegação

O ícone de minimizar NCS encontra-se no canto superior direito da interface do software de controlo.

Ícone de acesso	Nome do ícone	Descrição
	Minimizar NCS	Selecione para minimizar o NCS para aceder às pastas e aplicações do Windows.

## Botão de alimentação

O botão de alimentação na parte frontal do NextSeq liga a alimentação do instrumento e o computador do instrumento. O botão de alimentação executa as ações que se seguem, dependendo do estado de alimentação do instrumento.

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.

## Requisitos de palavra-passe do Windows

O sistema operativo requer uma alteração de palavra-passe do Windows a cada 180 dias. Quando solicitado, atualize a sua palavra-passe do Windows. Caso utilize o Local Run Manager para análise, atualize também a palavra-passe da conta Windows no Local Run Manager. Consulte a secção Especificar as definições das contas de serviços no *Local Run Manager Software Guide (Guia do software Local Run Manager)* (documento n.º 1000000002702).

## Descrição geral dos consumíveis de sequenciação

### Conteúdo e armazenamento

Os consumíveis de sequenciação necessários para executar o NextSeq são fornecidos separadamente num kit de utilização única. Cada kit inclui uma célula de fluxo, um cartucho de reagentes, um cartucho de tampão e um tampão de diluição de bibliotecas. Quando receber o NextSeq 500 Kit:

- ▶ Não abra a embalagem com folha de alumínio da célula de fluxo até ser instruído para tal.

- ▶ Armazene os componentes imediatamente nas temperaturas indicadas para garantir o desempenho adequado.
- ▶ Armazene os componentes de forma que as etiquetas da embalagem fiquem viradas para cima.

Consumível	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Descrição
cartucho de reagente	1	-25°C a -15°C	Contém reagentes de clustering e sequenciação
cartucho de tampão	1	15 °C a 30 °C	Contém a solução de lavagem e tampão
HT1	1	-25°C a -15°C	Tampão de hibridização
célula de fluxo	1	2°C a 8°C*	Célula de fluxo de utilização única

\*Enviado à temperatura ambiente para os NextSeq v2.5 Reagents Kits

Os reagentes são sensíveis à luz. Armazene o cartucho de reagentes e o cartucho de tampão num local escuro afastado de fontes de luz.

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

Todos os outros kits incluem primers de sequenciação de índice duplo e NaOCl no cartucho previamente cheio. Não são necessários passos adicionais.



### ATENÇÃO

Os NextSeq v2.5 Reagent Kits requerem o NCS v2.2 ou uma versão posterior. Certifique-se de que as atualizações de software estão concluídas antes de preparar as amostras e os consumíveis.

## Etiquetas e compatibilidade dos kits

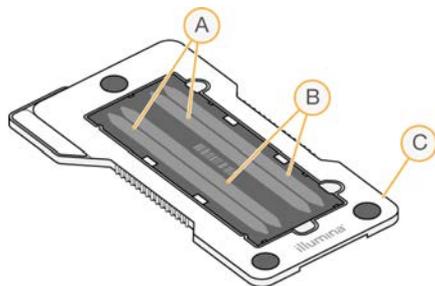
Os componentes do kit são identificados com indicadores codificados por cores para demonstrar a compatibilidade entre as células de fluxo e os cartuchos de reagentes. Utilize sempre um cartucho de reagentes e célula de fluxo compatíveis. O cartucho de tampão é universal.

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 3** Cartucho da célula de fluxo



- A Par de pistas A — Pistas um a três
- B Par de pistas B — Pistas dois a quatro
- 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 quatro pistas cujas imagens são adquiridas em pares.

- ▶ Para as pistas um e três (par de pistas A), são adquiridas as imagens ao mesmo tempo.
- ▶ Para as pistas dois e quatro (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 quatro pistas, apenas uma biblioteca individual ou um 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 quatro pistas.

São adquiridas imagens de cada pista em pequenas áreas de aquisição de imagens, designadas blocos. Para mais informações, consulte *Blocos da célula de fluxo na página 51*.

## Descrição geral do cartucho de reagentes

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

**Figura 4** 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.

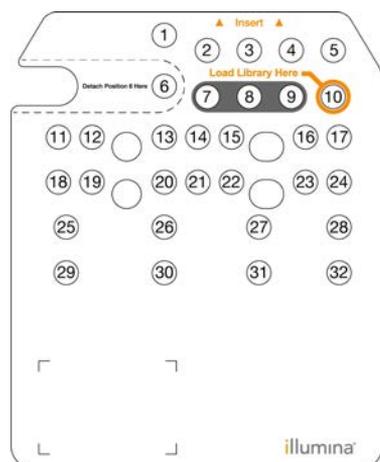


### AVISO

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 as FDS em [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Reservatórios reservados

Figura 5 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 *NextSeq Custom Primers Guide (Guia de primers personalizados do NextSeq)* (documento n.º 15057456).

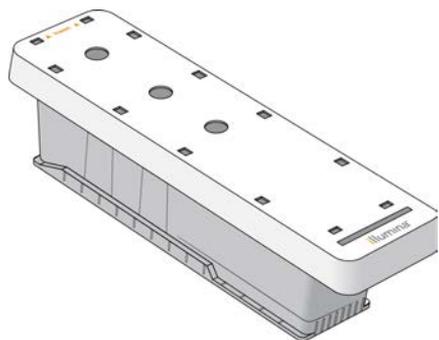
## Reservatório amovível na posição n.º 6

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 seis é amovível. Para mais informações, consulte *Remover o reservatório usado da posição n.º 6* na página 24.

## 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 6 Cartucho de tampão



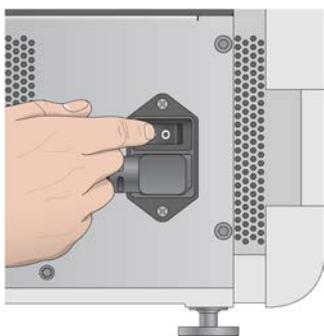
# Capítulo 2 Primeiros passos

Ligar o instrumento .....	10
Personalizar as definições do sistema .....	11
Personalizar definições do ensaio .....	12
Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador .....	13

## Ligar o instrumento

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

**Figura 7** 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.

**Figura 8** Botão de alimentação localizado na parte frontal do instrumento



- 2 Aguarde até que o sistema operativo termine o carregamento. O NextSeq Control Software (NCS) inicia e inicializa o sistema automaticamente. Após a conclusão do passo de inicialização, abre-se o ecrã Home (Início).
- 3 Caso o sistema tenha sido configurado de modo a requerer credenciais de início de sessão, aguarde o carregamento do sistema e, depois, inicie sessão no sistema operativo. Se necessário, consulte o administrador da instalação para obter o nome de utilizador e a palavra-passe.

## Personalizar as definições do sistema

O software de controlo inclui definições do sistema personalizáveis para o que se segue. Para alterar as definições de configuração da rede, consulte *Configurar as definições do sistema na página 43*.

- ▶ Personalizar a identificação do instrumento (avatar e alcunha)
- ▶ Definir a opção do teclado e o indicador de áudio
- ▶ Definir a opção de receitas personalizadas
- ▶ Definir Check for Instrument Software Updates (Verificar atualizações de software do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Definir a opção de enviar dados de desempenho do instrumento

## Personalizar o avatar e a alcunha do instrumento

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

## Definir a opção do teclado e o indicador de áudio

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 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.
- 4 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
- 5 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e avançar no ecrã.

## Definir a opção de receitas personalizadas

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Selecione a caixa de verificação **Enable Custom Recipes** (Ativar receitas personalizadas) para ativar a seleção de uma receita personalizada quando carregar um cartucho de reagentes. Para mais informações, consulte *Receitas personalizadas e pastas de receitas na página 40*.
- 4 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e avançar no ecrã.

## Definir Check for Instrument Software Updates (Verificar atualizações de software do instrumento) no BaseSpace

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Selecione a caixa de verificação **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Verificar automaticamente se há novas atualizações de software no BaseSpace) para ativar as verificações automáticas de atualizações do BaseSpace Sequence Hub.  
A verificação automática de atualizações é realizada a cada 24 horas. Quando uma atualização se encontra disponível, é apresentada uma notificação nos locais que se seguem.
  - ▶ No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento) no ícone de atualização de software.
  - ▶ No botão Manage Instrument (Gerir instrumento) no ecrã inicial.
- 4 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e avançar no ecrã.

## Definir a opção de enviar dados de desempenho do instrumento

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento para a Illumina) para ativar o serviço de monitorização Illumina Proactive. O nome da definição na interface do software pode ser diferente do nome neste guia, 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 100000052503)*.  
Este serviço:
  - ▶ Não envia dados de sequenciação.
  - ▶ Requer que o instrumento esteja ligado a uma rede com acesso à Internet.
  - ▶ Está ligado por predefinição. Para cancelar este serviço, desative a definição **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento para a Illumina).
- 4 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e avançar no ecrã.

## Personalizar definições do ensaio

O software de controlo inclui definições personalizáveis para as preferências de configuração de ensaios e a purga dos reagentes não usados.

## Definir as opções de configuração do ensaio

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 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.

- 4 Selecione a caixa de verificação **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Ignorar a confirmação da verificação pré-ensaio) para iniciar a sequenciação automaticamente após uma verificação automática bem-sucedida.
- 5 Selecione **Save** (Guardar) para guardar as definições e sair do ecrã.

## Definir a opção de purga automática

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 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.

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

## Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador

Os seguintes consumíveis e equipamento são utilizados no NextSeq 500.

### Consumíveis para sequenciação

Consumível	Fornecedor	Finalidade
1 N NaOH (hidróxido de sódio)	Fornecedor geral do laboratório	Desnaturação de bibliotecas, diluídas a 0,2 N
Toalhetas com álcool isopropílico a 70% ou Etanol a 70%	WWR, 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	WWR, catálogo n.º 21905-026 (ou equivalente)	Limpeza da célula de fluxo

### Consumíveis para manutenção e resolução de problemas

Consumível	Fornecedor	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)
Reagente ou metanol de grau espectrofotométrico ou álcool isopropílico (99%), frasco de 100 ml	Fornecedor geral do laboratório	Limpeza periódica de componentes óticos e auxiliar na limpeza do cartucho

Consumível	Fornecedor	Finalidade
Filtro de ar	Illumina, catálogo n.º 20022240	Para instrumentos com um filtro de ar acessível a partir do painel posterior. Limpeza do 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

Item	Origem	Finalidade
Congelador, -25 °C a -15 °C, sem gelo	Fornecedor geral do laboratório	Armazenar o cartucho
Balde para gelo	Fornecedor geral do laboratório	Reservar bibliotecas
Frigorífico, 2 °C a 8 °C	Fornecedor geral do laboratório	Armazenar a célula de fluxo

# Capítulo 3 Sequenciação

Introdução .....	15
Criar ensaio com o Local Run Manager Software .....	16
Criar ensaio com o NCS .....	16
Preparar o cartucho de reagentes .....	16
Preparar a célula de fluxo .....	17
Preparar bibliotecas para sequenciação .....	18
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 NextSeq 500, prepare um cartucho de reagentes e um fluxo de célula. Depois, 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 terminadores de cadeia 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 nas localizações que se seguem.

- ▶ A interface do NCS
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Local Run Manager
- ▶ Um computador de rede que utiliza o software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Consulte *Sequencing Analysis Viewer* na página 26.

## Análise

À medida que o ensaio avança, o software de controlo transfere automaticamente os ficheiros de identificação de bases (base call, BCL) para o BaseSpace Sequence Hub, o Local Run Manager ou outra localização de saída especificada para a análise secundária.

Estão disponíveis vários métodos de análise, dependendo da sua aplicação. Para mais informações, consulte a *ajuda do BaseSpace* ou o *Local Run Manager Software Guide (Guia do software Local Run Manager)* (documento n.º 1000000002702).

## 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 em cada leitura (2 x 150), mais até oito ciclos cada para duas leituras de indexação.

Para intervalos de duração esperados e outras especificações do sistema, visite a [página de especificações do NextSeq 500](#) no sítio Web da Illumina.

## Número de ciclos numa leitura

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

## Criar ensaio com o Local Run Manager Software

O processo para configurar os parâmetros de ensaio e análise no Local Run Manager varia dependendo do módulo de fluxo de trabalho de análise particular que utilizar. Consulte o guia do módulo do Local Run Manager para obter instruções específicas sobre como criar um ensaio.

- 1 No ecrã inicial, selecione **Edit Runs** (Editar ensaios).
- 2 Selecione **Create Run** (Criar ensaio) no painel do Local Run Manager e, depois, selecione um módulo de análise.
- 3 Introduza o nome de um ensaio, introduza as amostras do ensaio e, se aplicável, importe manifestos.
- 4 Guarde o ensaio e feche a janela do painel do Local Run Manager.

Para criar um ensaio no NCS, sem o software Local Run Manager, utilize o modo de ensaio manual. Consulte [Criar ensaio com o NCS na página 16](#) e [Modos de ensaio na página 19](#).

## Criar ensaio com o NCS

Caso crie um ensaio com o NCS (modo de ensaio manual), os parâmetros do ensaio e da análise são automaticamente introduzidos antes de carregar a célula de fluxo.

- 1 Reveja os parâmetros do ensaio e da análise necessários em [Introduzir os parâmetros do ensaio e de análise no NCS \(modo de ensaio manual\) na página 20](#).
- 2 Determine os parâmetros do ensaio e da análise agora para que não haja atrasos quando iniciar o ensaio de sequenciação.

## Preparar o cartucho de reagentes

- 1 Retire o cartucho de reagentes do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
- 2 Descongele num banho com água à temperatura ambiente até estar descongelado (aprox. 60 minutos). Não mergulhe o cartucho.
- 3 Bata levemente na bancada para desalojar a água da base e, depois, seque a base.

**[Método alternativo]** Descongele durante a noite de 2 °C a 8 °C. São necessárias, pelo menos, 18 horas para que os reagentes descongelem. A esta temperatura, os reagentes encontram-se estáveis durante até uma semana.

- 4 Inverta o cartucho cinco vezes para misturar os reagentes.
- 5 Inspeccione as posições 29, 30, 31 e 32 para se assegurar de que os reagentes estão descongelados.
- 6 Bata levemente na bancada para reduzir as bolhas de ar.



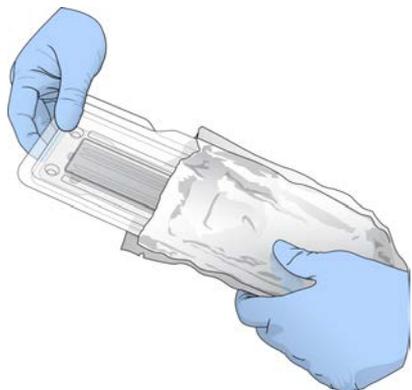
#### AVISO

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 as FDS em [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Preparar a célula de fluxo

- 1 Retire uma nova embalagem de célula de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- 2 Remova a célula de fluxo da embalagem de alumínio.

Figura 9 Remover da embalagem de alumínio



- 3 Coloque a embalagem da célula de fluxo desembulhada 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.

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

Figura 10 Remover da embalagem articulada



- 5 Limpe a superfície de vidro da célula de fluxo com um pano sem pelo e com álcool. Seque o vidro com um pano com libertação reduzida de pelo.

## Preparar bibliotecas para sequenciação

O volume da biblioteca e a concentração de carregamento diferem consoante a versão do NCS em execução.

Versão do software de controlo	Volume da biblioteca	Concentração da biblioteca
NCS v1.3 ou posterior	1,3 ml	1,8 pM
NCS v1.2 ou anterior	3 ml	3 pM

## Desnaturar e diluir bibliotecas

Desnature e dilua as suas bibliotecas segundo o volume de carregamento e a concentração que se seguem.

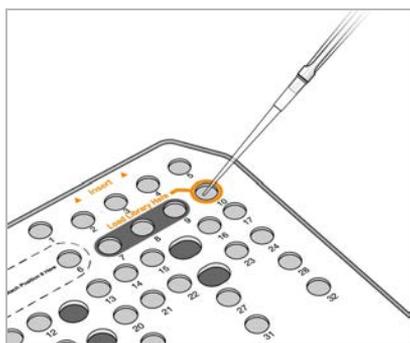
Tipo de kit	Volume de carregamento	Concentração de carregamento
Saída elevada	1,3 ml	1,8 pM
Saída intermédia	1,3 ml	1,5 pM

Na prática, a concentração de carregamento pode variar dependendo da preparação da biblioteca e dos métodos de quantificação. Para obter instruções, consulte o *NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do sistema NextSeq) (documento n.º 15048776)*.

## Carregar bibliotecas no 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 11 Carregar bibliotecas



## Configurar um ensaio de sequenciação

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Experiment** (Experiência).

- No ecrã Select Assay (Selecionar ensaio), selecione **Sequence** (Sequência).  
O comando Sequence (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.

## Modos de ensaio

Ao configurar um ensaio de configuração, tem de seleccionar um dos seguintes modos de ensaio para determinar onde introduzir as informações do ensaio e como analisar os dados.

Run Mode (Modo de ensaio)	Informações do ensaio	Data Analysis* (Análise de dados)
Local Run Manager	Introduzir no Local Run Manager.	O software guarda os dados numa pasta de saída especificada para análise automática no Local Run Manager.
Manual	Introduzir no NCS.	O software guarda os dados numa pasta de saída especificada para análise posterior fora do instrumento.

\*Para efeitos de análise, o BaseSpace Sequence Hub pode emparelhar com qualquer um dos modos de ensaio. Quando o modo de ensaio for o Local Run Manager e o BaseSpace Sequence Hub estiver configurado, ambas as aplicações analisam os dados.

O Local Run Manager é o modo de ensaio predefinido e oferece um fluxo de trabalho mais simplificado. No Local Run Manager, pode criar e guardar ensaios. As informações são enviadas para o software de controlo, onde seleciona um ensaio e continua a configuração do ensaio. Após a sequenciação, o Local Run Manager realiza automaticamente uma análise de dados. Não são necessárias folhas de amostra e aplicações de análise em separado.



### NOTA

O Local Run Manager não é uma funcionalidade do software de controlo. É o software integrado para registar amostras para sequenciação, especificar parâmetros do ensaio e analisar dados.

## BaseSpace Sequence Hub (opcional)

Ao configurar um ensaio de sequenciação, pode seleccionar uma das seguintes opções do BaseSpace Sequence Hub.

Opção	Descrição e requisitos
<b>Run Monitoring and Storage</b> (Armazenamento e monitorização de ensaios)	Enviar ficheiros InterOp, ficheiros de registo e dados de ensaio para o BaseSpace Sequence Hub para análise e monitorização remota. Requer uma conta do BaseSpace Sequence Hub, uma ligação à Internet e uma folha de amostra.
<b>Run Monitoring Only</b> (Apenas monitorização do ensaio)	Enviar ficheiros InterOp e ficheiros de registo para o BaseSpace Sequence Hub para monitorização remota do ensaio. Esta opção é a predefinição. Requer uma conta do BaseSpace Sequence Hub e uma ligação à Internet.

## Selecionar modo de ensaio e BaseSpace Sequence Hub

- No ecrã Run Setup (Configuração do ensaio), selecione um dos seguintes modos de ensaio.
  - ▶ Local Run Manager
  - ▶ Manual
- [Opcional]** Selecione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Utilizar definição do BaseSpace Sequence Hub) e, depois, selecione uma das opções que se seguem.

- ▶ Run Monitoring and Storage (Armazenamento e monitorização de ensaios)
- ▶ Run Monitoring Only (Apenas monitorização do ensaio)

Introduza o seu nome de utilizador e palavra-passe do BaseSpace Sequence Hub.

Se lhe for pedido, selecione um fluxo de trabalho para o qual carregar dados do ensaio.

Apenas é solicitado se pertencer a vários grupos de trabalho.

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

## Selecionar um ensaio (Local Run Manager Run Mode)

- 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 Confirme os parâmetros do ensaio.
  - ▶ **Run Name** (Nome do ensaio) — Nome do ensaio conforme atribuído no Local Run Manager.
  - ▶ **Library ID** (ID da biblioteca) — Nome das bibliotecas agrupadas conforme designado no Local Run Manager.
  - ▶ **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.
- 3 **[Opcional]** Selecione o ícone **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 mais informações, consulte o *NextSeq Custom Primers Guide (Guia 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.
- 4 Selecione **Next** (Seguinte).

## Introduzir os parâmetros do ensaio e de análise no NCS (modo de ensaio manual)

- 1 Introduza um nome do ensaio da sua preferência.
- 2 **[Opcional]** Introduza uma ID da biblioteca da sua preferência.
- 3 Na lista pendente Recipe (Receita), selecione uma receita. São listadas apenas as receitas compatíveis.
- 4 Selecione um tipo de leitura, **Single-Read** (Leitura única) ou **Paired-End** (Leitura emparelhada).
- 5 Introduza o número de ciclos para cada leitura no ensaio de sequenciação.
  - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Introduza um valor até 151 ciclos.
  - ▶ **Read 2** (Leitura 1) — Introduza um valor até 151 ciclos. Este valor é normalmente o mesmo número de ciclos que a Leitura 1.
  - ▶ **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).

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

6 **[Opcional]** Se estiver a utilizar primers personalizados, selecione a caixa de verificação para os primers utilizados. Para mais informações, consulte o *NextSeq Custom Primers Guide (Guia de primers personalizados do NextSeq)* (documento n.º 15057456).

- ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Primer personalizado para a Leitura 1.
- ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Primer personalizado para a Leitura 2.
- ▶ **Index 1** (Indexação 1) — Primer personalizado para a Indexação 1.
- ▶ **Index 2** (Indexação 2) — Primer personalizado para a Indexação 2.

7 Defina a localização da pasta de saída para o ensaio atual. Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até um local de rede.

Para informações sobre os requisitos da pasta de saída, consulte *Definir a localização da pasta de saída* na página 44.

8 Selecione **Browse** (Procurar) para navegar para uma folha de amostras.

Os sistemas configurados para o modo manual com Run Monitoring and Storage (Armazenamento e monitorização de ensaios) no BaseSpace Sequence Hub requerem uma folha de amostra.

9 Selecione **Purge consumables for this run** (Purgar os consumíveis para este ensaio).

A definição purga os consumíveis automaticamente após o ensaio atual.

10 Selecione **Next** (Seguinte).

11 **[Opcional]** Selecione o ícone Edit (Editar) para alterar os parâmetros do ensaio.

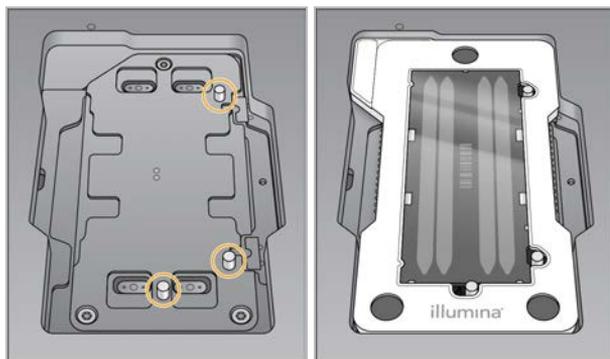
12 Selecione **Next** (Seguinte).

## Carregar a célula de fluxo

1 Remova a célula de fluxo usada num ensaio anterior.

2 Alinhe a célula de fluxo com os pinos de alinhamento e coloque a célula de fluxo no estrado.

Figura 12 Carregar a célula de fluxo



3 Selecione **Load** (Carregar).

A porta fecha automaticamente, o ID da célula de fluxo é apresentado no ecrã e os sensores são verificados.

4 Selecione **Next** (Seguinte).

## Esvaziar o recipiente de reagentes gastos

- 1 Remova o recipiente de reagentes gastos e elimine o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.

**Figura 13** Remover o recipiente de reagentes gastos



### NOTA

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

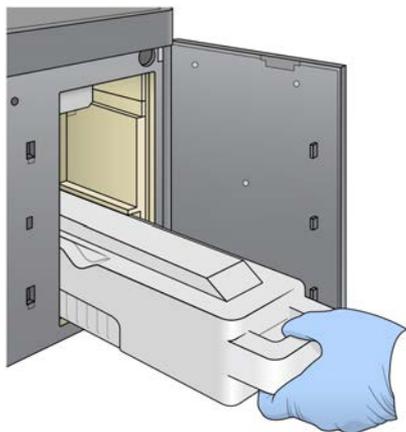


### AVISO

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 as FDS em [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- 2 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.

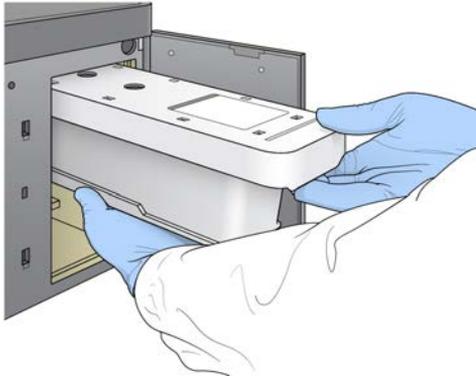
**Figura 14** Carregar o recipiente de reagentes gastos vazio



## Carregar o cartucho de tampão

- 1 Remova o cartucho de tampão usado do compartimento superior.
- 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 15 Carregar o cartucho de tampão



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

## Carregar o cartucho de reagentes

- 1 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 as FDS em [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

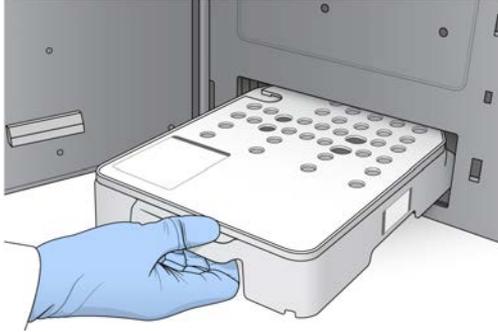


### NOTA

Para facilitar a eliminação segura do reagente não usado, o reservatório na posição 6 é amovível. Para mais informações, consulte *Remover o reservatório usado da posição n.º 6* na página 24.

- 2 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 16** Carregar o cartucho de reagentes

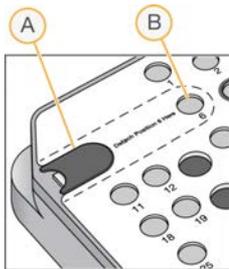


- 3 Selecione **Load** (Carregar).  
O software desloca o cartucho para a posição automaticamente (~30 segundos), a ID do cartucho de reagentes aparece no ecrã e os sensores são verificados.
- 4 Selecione **Next** (Seguinte).

## 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 17** 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.

## Rever a verificação automatizada

O software executa uma verificação automatizada 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.
- ▶ **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 36.

Para parar uma verificação automática em curso, selecione o ícone  no canto inferior direito. Para reiniciar a verificação, selecione o ícone . A verificação é retomada na primeira verificação incompleta ou falhada. Para ver os resultados de cada verificação individual numa categoria, selecione o ícone  para expandir a categoria.



**NOTA**

Quando realiza o primeiro ensaio de sequenciação com o NCS v4.0 ou uma versão posterior, é normal que o registo da célula de fluxo demore mais de 15 minutos durante a verificação automática do sistema.

**Iniciar o ensaio**

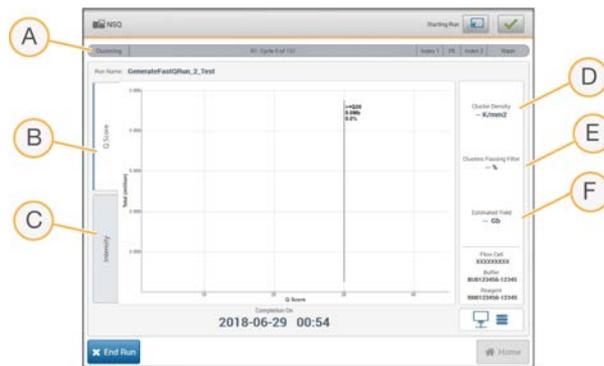
Quando a verificação automatizada estiver concluída, selecione **Start** (Iniciar). O ensaio de sequenciação inicia.

Para configurar o sistema para iniciar o ensaio automaticamente após uma verificação bem-sucedida, consulte *Definir as opções de configuração do ensaio na página 12*.

**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 18** 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. Utilize o tempo restante no canto superior direito para determinar a duração real.
- B **Q-Score** (Pontuação Q) — Apresenta a distribuição das pontuações de qualidade (pontuações Q). Consulte *Pontuação de qualidade na página 50*.
- C **Intensity** (Intensidade) — Apresenta o valor das intensidades dos clusters do 90º percentil para cada bloco. As cores do gráfico indicam cada base: o vermelho corresponde à base A, o verde à C, o azul à G e o preto à T. As cores correspondem aos indicadores da base utilizados no Sequencing Analysis Software (SAV).
- D **Cluster Density (K/mm²)** (Densidade de 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 49*.

F **Estimated Yield (Gb)** (Rendimento estimado [Gb]) — Apresenta o número de bases projetadas para o ensaio.



**NOTA**

Depois de selecionar Home (Início), não é possível regressar para visualizar as métricas do ensaio. No entanto, as métricas encontram-se acessíveis no BaseSpace Sequence Hub 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 cinco ciclos são reservados para a geração de modelos.
- ▶ As métricas do ensaio são apresentadas após o ciclo 25, incluindo a densidade de clusters, os clusters que passam pelo filtro, o rendimento e as pontuações de qualidade.

## Transferência de dados

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

Estado	Local Run Manager	Pasta de saída	Illumina BaseSpace
Ligado			
Ligado e a transferir os dados			
Desligado			
Desativado			

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.

## Universal Copy Service

O NextSeq System Software Suite inclui um Universal Copy Service. 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 mais informações, consulte o *Sequencing Analysis Viewer User Guide (Guia 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 está concluído, o software inicia uma lavagem automática. A lavagem automática pós-ensaio utiliza uma solução de lavagem fornecida com o cartucho de tampão e NaOCl fornecido com o cartucho de reagentes.

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 Manutenção

Introdução .....	28
Realizar uma lavagem manual .....	28
Substituição do filtro de ar .....	31
Atualizações de software .....	32
Encerrar o instrumento .....	34

## Introdução

Os procedimentos de manutenção incluem lavagens manuais do instrumento, substituição do filtro de ar e atualizações do 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 28*.
- ▶ **Atualizações do software** — Quando está disponível uma versão atualizada do software do sistema, pode instalar a atualização automaticamente seguindo um dos dois métodos seguintes.
  - ▶ Com uma ligação ao BaseSpace Sequence Hub
  - ▶ Manualmente após transferir o instalador do sítio Web da Illumina. Consulte *Atualizações de software na página 32*.
- ▶ **Substituição do filtro de ar** — Para instrumentos com um filtro de ar acessível a partir do painel posterior, 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.

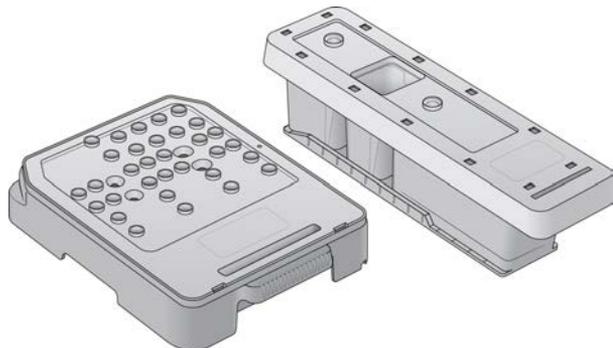
## Realizar uma lavagem manual

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.

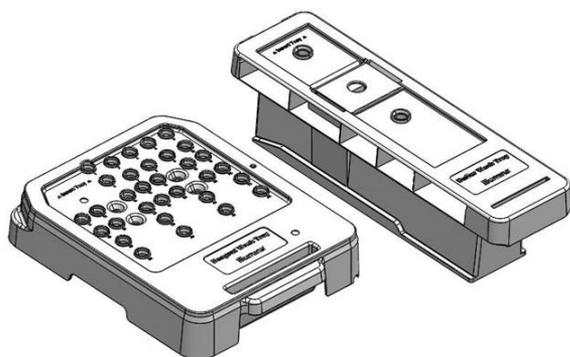
Tipos de lavagem	Descrição
<b>Lavagem rápida</b> <b>Duração: 20 minutos</b>	Irriga o sistema com uma solução de lavagem fornecida pelo utilizador de água laboratorial e Tween 20 (cartucho de lavagem de tampão). É necessário realizá-la a cada 14 dias de inatividade do instrumento ou após um encerramento.
<b>Lavagem manual pós-ensaio</b> <b>Duração: 90 minutos</b>	Irriga o sistema com uma solução de lavagem fornecida pelo utilizador de água 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 19** Cartucho de lavagem de reagentes e cartucho de lavagem de tampão no estilo original.



**Figura 20** Cartucho de lavagem de reagentes e cartucho de lavagem de tampão no estilo novo.



## Preparar uma lavagem manual pós-ensaio

Consumíveis fornecidos pelo utilizador	Volume e descrição
<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOCl</li> </ul>	1 ml, diluído a 0,12% Carregado no cartucho de lavagem de reagentes (posição n.º 28)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100% Tween 20</li> <li>• Água laboratorial</li> </ul>	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)

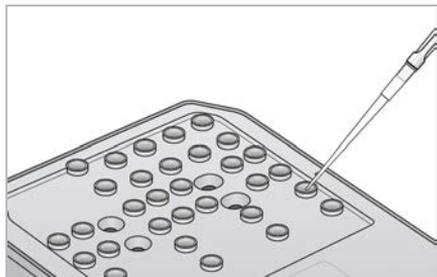


### NOTA

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.

- 1 Combine os seguintes volumes num tubo de microcentrifugação para obter 1 ml de NaOCl a 0,12%:
  - ▶ 5% de NaOCl (24 µl)
  - ▶ Água laboratorial (976 µl)
- 2 Inverta o tubo para misturar.
- 3 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 21 Carregar NaOCl



- 4 Combine os seguintes volumes para obter uma solução de lavagem de Tween 20 a 0,05%:
  - Cartucho de lavagem de tampão no estilo original
    - ▶ 100% Tween 20 (62 µl)
    - ▶ Água laboratorial (125 ml)
    - ▶ Adicione 125 ml de solução de lavagem ao reservatório central do cartucho de lavagem de tampão.
  - Cartucho de lavagem de tampão no estilo novo
    - ▶ 100% Tween 20 (75 µl)
    - ▶ Água laboratorial (150 ml)
    - ▶ Adicione 150 ml de solução de lavagem ao reservatório central do cartucho de lavagem de tampão.
- 5 Selecione **Perform Wash** (Realizar lavagem) e, em seguida, selecione **Manual Post-Run Wash** (Lavagem manual pós-ensaio).

## Preparar uma lavagem rápida

Consumíveis fornecidos pelo utilizador	Volume e descrição
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100% Tween 20</li> <li>• Água laboratorial</li> </ul>	Utilizada para preparar a solução de lavagem de 40 ml de Tween 20 a 0,05% 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 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 as FDS em [support.illumina.com/sds.html](http://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.

## Substituição do filtro de ar

Os novos sistemas vêm com três filtros de ar suplentes. Estes devem ser armazenados e utilizados quando o instrumento pedir para mudar o filtro.

Para instrumentos com um filtro de ar acessível a partir da parte posterior, o filtro de ar garante um fluxo de ar apropriado através do instrumento. O software apresenta uma notificação para substituir 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 selecionar **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.

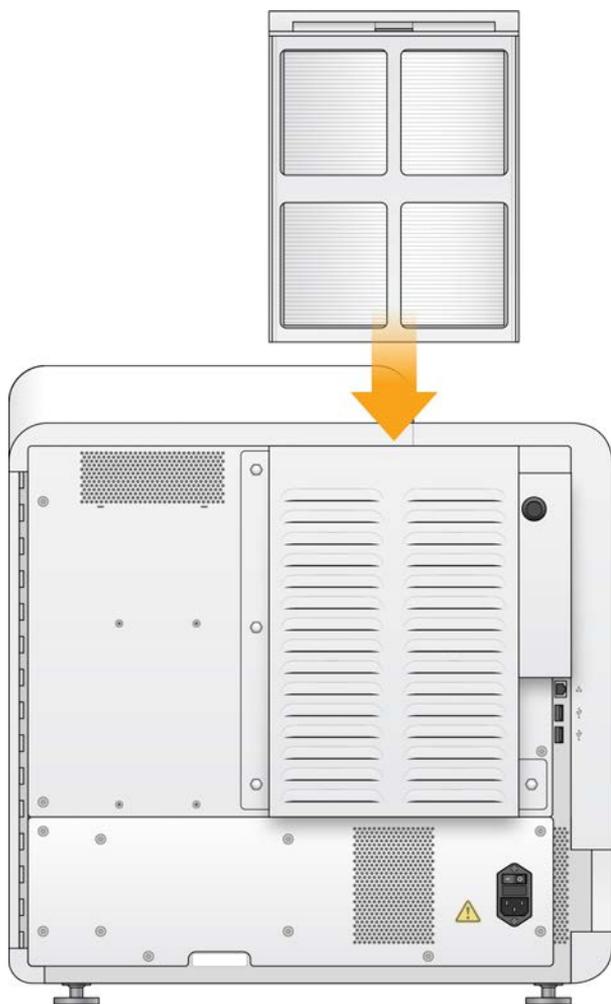


### NOTA

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 22 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
- ▶ Software Local Run Manager
- ▶ RTA2

- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Universal Copy Service
- ▶ Unidade de Direct Memory Access (DMA)

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 NextSeq 500](#) no sítio Web da Illumina. Caso planeie realizar uma atualização manual, certifique-se de que conclui a atualização antes de preparar as amostras e os consumíveis para um ensaio de sequenciação.

## 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.

## **Encerrar o instrumento**

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



#### **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.

# Anexo A Resolução de problemas

Introdução .....	35
Ficheiros de resolução de problemas .....	35
Resolver erros de verificação automática .....	36
O recipiente de reagentes gastos está cheio .....	37
Fluxo de trabalho de rehibridização .....	37
Receitas personalizadas e pastas de receitas .....	40
Verificação do sistema .....	40
Mensagem de erro RAID .....	42
Erro de armazenamento de rede .....	42
Configurar as definições do sistema .....	43

## Introdução

Para questões técnicas, visite as páginas de assistência do NextSeq 500 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 59](#).

Considere partilhar uma hiperligação para o resumo do ensaio com a Assistência técnica da Illumina no BaseSpace Sequence Hub, para facilitar a resolução de problemas. Também pode apoiar a resolução de problemas através da ativação do serviço de monitorização Illumina Proactive. Para mais informações sobre o serviço, consulte [Definir a opção de enviar dados de desempenho do instrumento na página 12](#).

## 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. Os ficheiros encontram-se em pastas específicas do ensaio na pasta de saída.

Ficheiro principal	Subpasta	Descrição
Ficheiro de informações do ensaio (RunInfo.xml)	<Nome da pasta do ensaio>	Contém as seguintes informações: <ul style="list-style-type: none"><li>• Nome do ensaio</li><li>• Número de ciclos no ensaio</li><li>• Número de ciclos em cada leitura</li><li>• Se a leitura é uma leitura indexada</li><li>• Número de faixas e blocos na célula de fluxo</li></ul>
Ficheiro de parâmetros do ensaio (RunParameters.xml)	<Nome da pasta do ensaio>	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)	Data\Intensities	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	Subpasta	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.
Ficheiros de registo da pista (*LaneLog*.txt)	Registos RTA	Registo dos eventos de processamento RTA. Os ficheiros de registo da pista 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. Os ficheiros encontram-se em pastas específicas do ensaio na pasta de saída. Inclua o registo de erros quando comunicar problemas à Assistência técnica da Illumina.

## Resolver erros de verificação automática

Se ocorrerem erros durante a verificação automática, utilize as seguintes ações recomendadas para resolver o erro.

No entanto, as RFID da célula de fluxo, do cartucho de reagentes e do cartucho de tampão serão bloqueadas durante uma iniciação do software de controlo, que pode ser necessária para resolver um erro. O utilizador deve remover a célula de fluxo, o cartucho de reagentes e o cartucho de tampão do instrumento antes de um reinício do sistema. Além disso, as RFID consumíveis são bloqueadas depois de os selos de alumínio serem perfurados.

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, seleccione <b>Back</b> (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"> <li>Nos ecrãs de configuração do ensaio, selecione <b>Back</b> (Voltar) para regressar ao passo da célula de fluxo. A porta do compartimento de aquisição de imagens abre-se.</li> <li>Descarregue e volte a carregar a célula de fluxo para garantir que está instalada corretamente.</li> </ul>

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.

## 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 rehibridização

Poderá ser necessário um ensaio de rehibridização 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 rehibridização.



## 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 rehibridização 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 rehibridização, 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 rehibridização 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 rehibridização

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

- ▶ **After cycle 5** (Após o ciclo 5) — As intensidades são apresentadas após o registo do modelo, o que exige os primeiros cinco 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 rehibridização posterior depois de iniciar a ressíntese de extremidade emparelhada.

## Consumíveis necessários

Um ensaio de rehibridização requer um novo cartucho de reagentes NextSeq 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). Guardar a célula de fluxo não garante que o ensaio atual possa ser guardado. Anote a data de validade para rehibridização.
- 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 rehibridização.



#### NOTA

Pode armazenar a célula de fluxo durante, no máximo, sete dias entre 2 °C e 8 °C na embalagem articulada de plástico **sem** a embalagem de dessecante. Para obter melhores resultados, efetue a rehibridização da célula de fluxo no prazo de três 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 28*.



#### 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 BaseSpace Sequence Hub

- 1 Caso o BaseSpace Sequence Hub esteja a ser utilizado, configure um novo ensaio utilizando os mesmos parâmetros que o ensaio original.



#### DICA

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 No ecrã Run Setup (Configuração do ensaio), selecione um dos seguintes modos de ensaio.
  - ▶ Local Run Manager
  - ▶ Manual
- 6 **[Opcional]** Selecione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Utilizar definição do BaseSpace Sequence Hub) e, depois, selecione uma das opções que se seguem.
  - ▶ Run Monitoring and Storage (Armazenamento e monitorização de ensaios)
  - ▶ Run Monitoring Only (Apenas monitorização do ensaio)
 Introduza o seu nome de utilizador e palavra-passe do BaseSpace Sequence Hub.
- 7 Carregue o novo cartucho de tampão e cartucho de reagentes.
- 8 Selecione **Next** (Seguinte) para prosseguir com a verificação pré-ensaio e iniciar o ensaio.

## 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.

## Verificação do sistema

Não é necessária uma verificação do sistema para o funcionamento normal ou manutenção do instrumento. No entanto, um representante da Assistência técnica da Illumina pode solicitar-lhe que efetue uma verificação do sistema para fins de resolução de problemas.



### NOTA

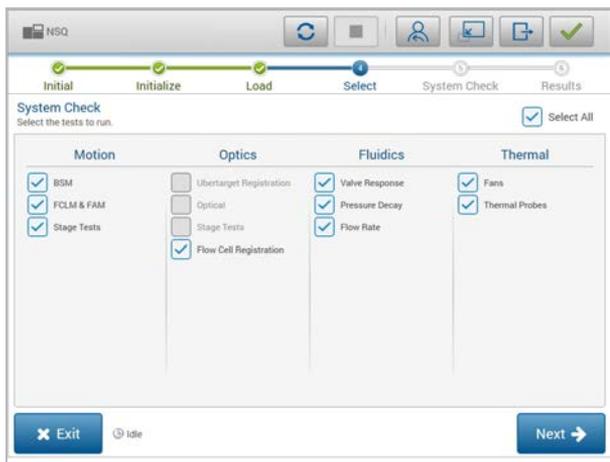
Se estiver prevista uma lavagem do instrumento, efetue a lavagem antes de iniciar uma verificação do sistema.

Iniciar uma verificação do sistema automaticamente fecha o software de controlo e inicia o NextSeq Service Software (NSS). O software do serviço arranca e abre uma página de início de sessão. Utilize quaisquer credenciais de nome de utilizador e palavra-passe do Local Run Manager (nível de administrador ou utilizador) para aceder ao NSS. Quando o NSS autenticado abrir no ecrã Load (Carregar), que está configurado para utilizar a opção de carregamento avançado.



As credenciais de administrador do Local Run Manager são necessárias para iniciar sessão no Service Software antes do aparecimento do ecrã de carregamento.

Figura 23 Verificações do sistema disponíveis



As caixas de verificação inativas no ecrã Select (Selecionar) indicam testes que exigem a assistência por um representante técnico da Illumina.

## Executar uma verificação do sistema

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Check** (Verificação do sistema). Quando lhe for pedido para fechar o software de controlo, selecione **Yes** (Sim).
  - 2 Carregue os consumíveis conforme se segue:
    - a Se ainda não estiver presente uma célula de fluxo no instrumento, carregue uma célula de fluxo usada.
- 

**NOTA**  
A Illumina recomenda a utilização de uma célula de fluxo de saída para fins de verificação do sistema.
- b Esvazie o recipiente de reagentes gastos e volte a colocá-lo no instrumento.
    - c Carregue o cartucho de lavagem de tampão com 120 ml de água laboratorial no reservatório central.
    - d Carregue o cartucho de lavagem de reagentes. Certifique-se de que o cartucho de lavagem de reagentes está vazio e limpo.
  - 3 Selecione **Load** (Carregar). O software desloca a célula de fluxo e o cartucho de lavagem de reagentes para a devida posição. Selecione **Next** (Seguinte).
  - 4 Selecione **Next** (Seguinte). A verificação do sistema inicia.
  - 5 **[Opcional]** Quando a verificação do sistema estiver concluída, selecione **View** (Ver) junto ao nome da verificação para ver os valores associados a cada verificação.
  - 6 Selecione **Next** (Seguinte). O relatório de verificação do sistema abre-se.
  - 7 Selecione **Save** (Guardar) para guardar o relatório num ficheiro comprimido. Navegue até uma localização da rede para guardar o ficheiro.
  - 8 Quando concluir, selecione **Exit** (Sair).
  - 9 Quando lhe for pedido para fechar o software de serviço e reiniciar o software de controlo, selecione **Yes** (Sim). O software de controlo reinicia automaticamente.

## Verificações do movimento

Verificação do sistema	Descrição
BSM	Verifica o ganho e a distância do Buffer Straw Mechanism (BSM) para confirmar que o módulo está a funcionar corretamente.
FCLM e FAM	Verifica o ganho e a distância do Flow Cell Load Mechanism (FCLM) e do Fluid Automation Module (FAM) para confirmar que os módulos estão a funcionar corretamente.
Testes de estrado	Verifica os limites de deslocação e o desempenho do estrado XY e dos seis estrados Z, um para cada câmara.

## Verificação da ótica

Verificação do sistema	Descrição
Registo da célula de fluxo	Mede a inclinação da célula de fluxo num plano ótico, testa a funcionalidade da câmara, testa o módulo de aquisição de imagens e verifica o registo da célula de fluxo na posição de aquisição de imagens correta.

## Verificações dos fluidos

Verificação do sistema	Descrição
Resposta da válvula	Verifica a exatidão dos movimentos da válvula e da bomba e testa a amplitude de movimentação da seringa da bomba.
Queda de pressão	Verifica a taxa de fuga de um sistema de fluidos selado, que confirma que a célula de fluxo está montada corretamente na posição de sequenciação.
Taxa de fluxo	Verifica a funcionalidade dos sensores de bolhas, que são utilizados para detetar a presença de ar nas linhas de reagente. Mede as taxas de fluxo para verificar a presença de oclusões ou fugas.

## Verificações térmicas

Verificação do sistema	Descrição
Ventoinhas	Verifica a velocidade das ventoinhas do sistema em impulso por minuto (IPM) para confirmar que as ventoinhas estão a funcionar. As ventoinhas que não estiverem a funcionar apresentam um valor negativo.
Sondas térmicas	Verifica a temperatura média de cada sensor térmico. Os sensores térmicos que não estiverem a funcionar apresentam um valor negativo.

## Mensagem de erro RAID

O computador do NextSeq encontra-se equipado com dois discos rígidos. 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 continuar, selecione **Acknowledge** (Confirmar) e, depois, **Close** (Fechar).

## Erro de armazenamento de rede

Os erros de armazenamento de rede são provocados por um dos seguintes motivos:

- ▶ **Espaço de armazenamento insuficiente para a pasta de saída** — Aumente a quantidade de espaço no dispositivo de armazenamento ou mova a pasta de saída para uma localização com armazenamento suficiente.
- ▶ **Não é possível ligar ao armazenamento de rede** — Verifique o caminho para a pasta de saída. Consulte *Definir a localização da pasta de saída na página 44*.
- ▶ **O sistema não consegue escrever no armazenamento de rede** — Consulte o seu administrador de TI para verificar as permissões. A Conta do Windows no sistema operativo do instrumento exige a permissão de leitura e escrita na pasta de saída.

A Conta do Windows no Local Run Manager também exige a permissão de leitura e escrita na pasta de saída. Consulte Especificar as definições das contas de serviços no *Local Run Manager Software Guide (Guia do software Local Run Manager) (documento n.º 1000000002702)*.

## 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.

- ▶ **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.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub** — Caso se utilize o BaseSpace Sequence Hub, este fornece opções de localização para onde os dados são transferidos para armazenamento e análise.
- ▶ **Output Folder Location** (Localização da pasta de saída) — Fornece opções de caminhos para a pasta de saída.

## Definir a configuração da rede

- 1 No ecrã Manage Instrument (Gerir instrumento), selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Selecione **Network Configuration** (Configuração da rede).
- 3 Selecione **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, selecione **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 quatro números separados por um ponto. Por exemplo, 168.62.20.37.
  - ▶ 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 Selecione **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, selecione **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 uma 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 configuração do BaseSpace

- 1 No ecrã Home (Início), selecione **Manage Instrument** (Gerir instrumento).
- 2 Selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 3 Selecione **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Configuração do BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Selecione uma das seguintes opções para especificar uma localização onde os dados são transferidos para análise.
  - ▶ Na lista Localização de alojamento, selecione a localização do servidor para onde os dados são carregados.
  - ▶ Se tiver uma subscrição empresarial, selecione a caixa de verificação **Private Domain** (Domínio privado) e introduza o nome do domínio (URL) utilizado para o início de sessão único no BaseSpace Sequence Hub.  
Por exemplo: <https://oseulaboratório.basespace.illumina.com>.
- 5 Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento para a Illumina) para ativar o serviço de monitorização Illumina Proactive. O nome da definição na interface do software pode ser diferente do nome neste guia, 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.
  - ▶ Está ligado por predefinição. Para cancelar este serviço, desative a definição **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento para a Illumina).
- 6 Selecione **Save** (Guardar).

## Definir a localização da pasta de saída

O NextSeq requer uma pasta de saída para todos os ensaios. Utilize o caminho de Universal Naming Convention (UNC) completo para a pasta de saída. O caminho UNC inclui duas barras invertidas, o nome do servidor e o nome do diretório, mas *não* inclui uma letra para uma unidade de rede mapeada.

- ▶ Os caminhos para a pasta de saída que são de um nível requerem uma barra invertida no fim.
  - ▶ Exemplo de caminho UNC: \\nomedoservidor\directory1\

- ▶ Os caminhos para a pasta de saída que são de dois ou mais níveis não requerem uma barra invertida no fim.
  - ▶ Exemplo de caminho UNC: \\nomedoservidor\directory1\directory2\
- ▶ Os caminhos para uma unidade de rede mapeada causam erros. **Não utilize estes caminhos.**
  - ▶ Exemplo de um caminho da unidade de rede mapeado: T:\sbsfiles

Para o modo de ensaio Local Run Manager, defina a localização da pasta de saída no software Local Run Manager. Para mais informações, consulte o *Local Run Manager Software Guide (Guia do software Local Run Manager)* (documento n.º 1000000002702).

# Anexo B Real-Time Analysis

Descrição geral do Real-Time Analysis .....	46
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis .....	47
Ficheiros de saída da sequenciação .....	51
Blocos da célula de fluxo .....	51
Estrutura da pasta de saída .....	55

## Descrição geral do Real-Time Analysis

O NextSeq 500 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**, gerado automaticamente no início do ensaio. O ficheiro fornece as informações que se seguem.
  - ▶ Nome do ensaio
  - ▶ Número de ciclos
  - ▶ Se uma leitura está indexada
  - ▶ 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 (*.bcl)	Cada bloco que é analisado é incluído num ficheiro de identificação de bases agregadas 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 (*.filter)	Cada bloco produz informações do filtro que são agregadas num ficheiro de filtro para cada pista. O ficheiro de filtro especifica se um cluster passa pelo filtro.

Tipo de ficheiro	Descrição
Ficheiros de localização de clusters (*.locs)	Os ficheiros de localização de clusters contêm as coordenadas X,Y de 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 (*.bci)	É produzido um ficheiro de indexação de identificação de bases 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. Em alternativa, utilize o software de conversão bcl2fastq para a conversão FASTQ e soluções de análise de terceiros. Os ficheiros NextSeq requerem o bcl2fastq v2.0 ou uma versão posterior. Para a versão mais recente do bcl2fastq, visite a [página de transferências do NextSeq](#) 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.

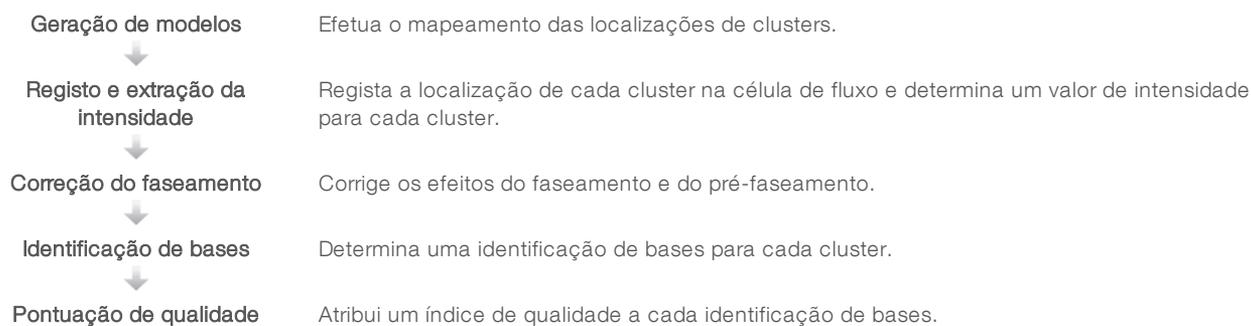
## Tratamento de erros

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 \*LaneNLog\*.tsv apresenta os eventos de processamento para cada pista.
- ▶ 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 cinco 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, uma base que não seja a base G nos primeiros **cinco** ciclos. Para quaisquer seqüências de indexação, o RTA v2 necessita de, pelo menos, uma base que não seja a base G nos primeiros **dois** 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), um 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.

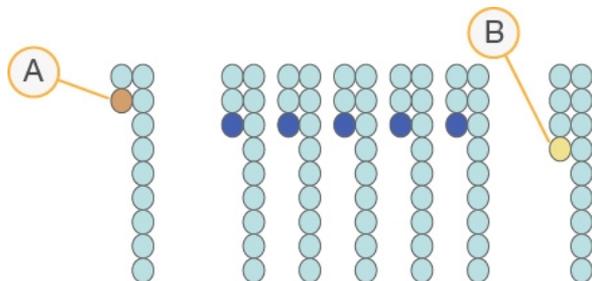
Se o registo falhar para quaisquer imagens num ciclo, não são geradas quaisquer identificações de bases para esse bloco nesse ciclo. Utilize o software Sequencing Analysis Viewer (SAV) para examinar as imagens miniatura e identificar as imagens que falharam no registo.

## Correção do faseamento

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

- ▶ O faseamento ocorre quando uma base fica para trás.
- ▶ O pré-faseamento ocorre quando uma base avança.

Figura 24 Faseamento e pré-faseamento



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

O RTA2 corrige os efeitos do faseamento e do pré-faseamento, 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 NextSeq 500 utiliza a sequenciação de dois canais, que requer apenas duas imagens para codificar os dados de quatro bases de ADN, uma do canal vermelho e outra do canal verde.

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

Figura 25 Visualização de intensidades de cluster

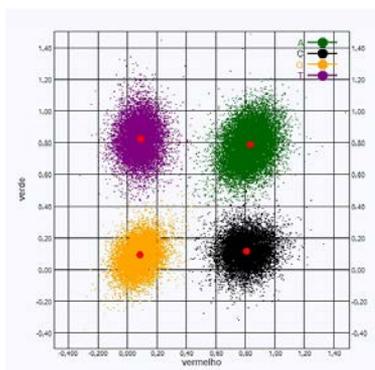


Tabela 1 Identificações de bases na sequenciação de dois canais

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 dois canais, o RTA2 utiliza um sistema com base na população para determinar a pureza de uma identificação de bases. O filtro de passagem (pass filter, PF) de clusters é ativado quando não houver mais de uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos com pureza < 0,63. A identificação de bases não é realizada nos clusters que não passarem no filtro.

## Considerações de indexação

O processo das leituras de índice de identificação de bases é diferente da identificação de bases durante outras leituras.

As leituras de índice têm de começar por pelo menos uma base diferente de G, num dos primeiros dois ciclos. Se uma leitura de índice começar por duas identificações de base de G, não será gerada qualquer intensidade de sinal. O sinal tem de estar presente num dos primeiros dois ciclos para garantir o desempenho da desmultiplexagem.

Para aumentar a robustez de desmultiplexagem, selecione sequências de indexação que forneçam um sinal, pelo menos, num 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 assegura a precisão ao analisar amostras de baixa-plexagem.

## 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.  $Q(X)$  representa os índices de qualidade, em que X é o índice. 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.

Após a determinação da pontuação Q, os resultados são registados nos ficheiros de identificação de bases.

## 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 um 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. <b>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]</b> — Os ficheiros são guardados numa pasta para cada pista. <b>[Ciclo].bcl.bgzf</b> , em que [Ciclo] representa o número do ciclo em quatro dígitos. Os ficheiros de identificação de bases são comprimidos com a compressão de blocos gzip.
Ficheiro de indexação de identificação 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. <b>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]</b> — Os ficheiros são guardados numa pasta para cada pista. <b>s_[Pista].bcl</b>
Ficheiros de localização de clusters	Para cada bloco, as coordenadas XY para todos os clusters são agregadas num ficheiro de localização de clusters para cada pista. Os ficheiros de localização de clusters são o resultado da geração de modelos. <b>Data\Intensities\L00[X]</b> — Os ficheiros são guardados numa pasta para cada pista. <b>s_[pista].locs</b>
Ficheiros de filtro	O ficheiro de filtro especifica se um cluster passou pelo filtro. As informações do filtro são agregadas num ficheiro de filtro para cada pista e leitura. Os ficheiros de filtro são gerados ao ciclo 26 com 25 ciclos de dados. <b>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]</b> — Os ficheiros são guardados numa pasta para cada pista. <b>s_[pista].filter</b>
Ficheiros InterOp	Ficheiros de comunicação binária utilizados para o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Os ficheiros InterOp são atualizados ao longo do ensaio. Pasta <b>InterOp</b>
Ficheiro de configuração RTA	Criado no início do ensaio, o ficheiro de configuração RTA indica as definições para o ensaio. <Nome da pasta do ensaio>, <b>RTAConfiguration.xml</b>
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. <Nome da pasta do ensaio>, <b>RunInfo.xml</b>
Ficheiros de miniatura	Uma imagem miniatura de cada canal de cor (vermelho e verde) para os blocos 1, 6 e 12 de todas as câmaras, superfície superior e superfície inferior, em todos os ciclos durante a aquisição de imagens. <b>Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]</b> — Ficheiros armazenados numa pasta para cada faixa e uma subpasta para cada ciclo. <b>s_[pista]_[bloco]_[canal].jpg</b> — No nome do ficheiro, o bloco é representado por um número de cinco dígitos que indica a superfície, a faixa, a câmara e o bloco. Para mais informações, consulte <i>Numeração dos blocos na página 54</i> e <i>Nomenclatura de imagens miniatura na página 54</i> .

## 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 de que forma as câmaras trabalham em conjunto para recolher as imagens.

- ▶ As células de fluxo de saída elevada têm um total de 864 blocos.
- ▶ As células de fluxo de saída intermédia têm um total de 288 blocos.

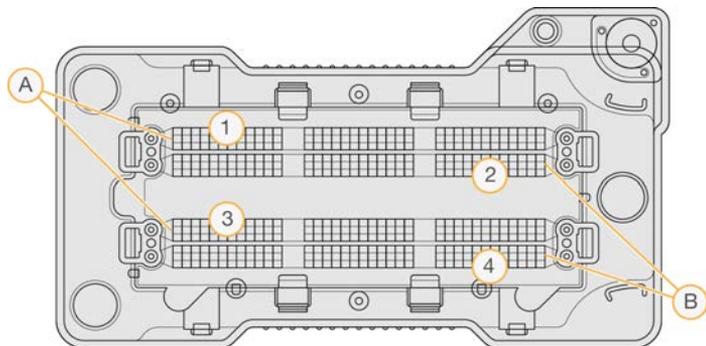
**Tabela 2 Blocos da célula de fluxo**

Componente da célula de fluxo	Saída elevada	Saída intermédia	Descrição
Pistas	4	4	Uma pista é um canal físico com portas de entrada e saída dedicadas.
Superfícies	2	2	São obtidas imagens da célula de fluxo em duas 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	1	Uma faixa é uma coluna de blocos numa pista.
Segmentos da câmara	3	3	O instrumento utiliza seis câmaras para adquirir imagens da célula de fluxo em três segmentos para cada pista.
Blocos por faixa por segmento da câmara	12	12	Um bloco é a área na célula de fluxo que a câmara visualiza como 1 imagem.
Total de imagens dos blocos	864	288	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 26** Numeração das pistas

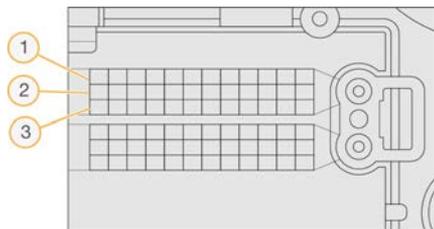


- A Par de pistas A — Pistas 1 e 3
- B Par de pistas B — Pistas 2 e 4

## Numeração das faixas

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

Figura 27 Numeração das faixas

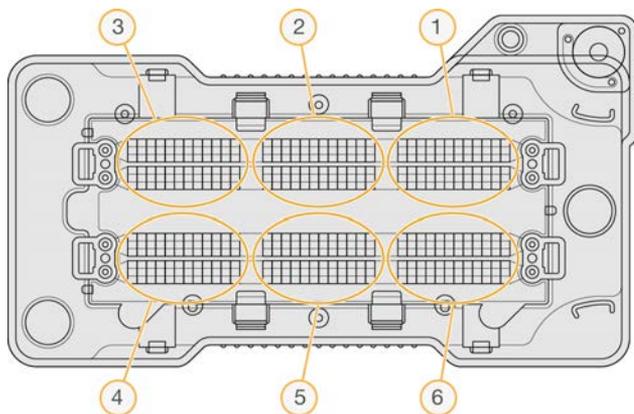


## Numeração das câmaras

O NextSeq 500 utiliza seis câmaras para adquirir imagens da célula de fluxo.

As câmaras são numeradas entre 1 e 6. Pista um de imagens das câmaras 1 a 3. Pista três 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.

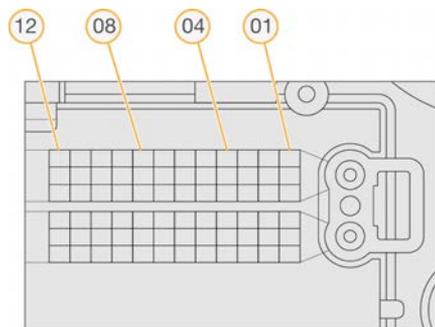
Figura 28 Numeração das câmaras e segmentos (célula de fluxo de saída elevada apresentada)



## 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 do segmento da câmara, e são representados em dois dígitos.

Figura 29 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 cinco dígitos é utilizado no nome do ficheiro das imagens miniatura e ficheiros de faseamento empírico. Para mais informações, consulte [Ficheiros de saída da sequenciação na página 51](#).

## Nomenclatura de imagens miniatura

É gerada uma imagem miniatura de cada canal de cor (vermelho e verde) para os blocos 1, 6 e 12 de todas as câmaras, superfície superior e superfície inferior, em todos os ciclos durante a aquisição de imagens. Os ficheiros de miniaturas são gerados no formato de ficheiro JPG.

É atribuído um nome a cada imagem com o número do bloco conforme indicado pela seguinte convenção de nomenclatura, a qual começa sempre por **s\_**:

- ▶ **Lane** (Pista) — 1, 2, 3 ou 4
- ▶ **Tile** (Bloco) — Um número de pista de cinco dígitos que indica a superfície, a faixa, a câmara e o bloco
- ▶ **Channel** (Canal) — Vermelho ou verde

**Exemplo:** `s_3_12512_green.jpg`, que indica a pista 3, superfície superior, faixa 2, câmara 5, bloco 12 e o canal verde.

## Estrutura da pasta de saída

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

### 📁 Data

#### 📁 Intensities

##### 📁 BaseCalls

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

📁 L002 — Ficheiros da identificação de bases para a pista 2, agregados num ficheiro por ciclo.

📁 L003 — Ficheiros da identificação de bases para a pista 3, agregados num ficheiro por ciclo.

📁 L004 — Ficheiros da identificação de bases para a pista 4, agregados num 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

#### 📁 Focus

📁 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** — Ficheiros de registo que descrevem os passos operacionais.

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

📁 **RTALogs** — Ficheiros de registo que descrevem os passos de análise.

📁 **Thumbnail\_Images** — Imagens miniatura dos blocos 1, 6 e 12 em cada faixa em todos os ciclos.

📄 RTAComplete.xml

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

# Index

## A

- ajuda
  - documentação 1
- ajuda técnica 59
- alertas de estado 4
- algoritmo Phred 50
- análise
  - ficheiros de saída 51
  - opções 19
- análise, primária
  - pureza do sinal 49
- apoio ao cliente 59
- assistência técnica 59

## B

- barra de estado 2
- BaseSpace Sequence Hub 1, 19
  - configuração 44
  - ícones de transferência 26
  - início de sessão 19, 39
- botão de alimentação 5, 10

## C

- cartucho de reagentes
  - descrição geral 7
  - preparação 16
  - reservatório n.º 28 29
- cartucho de tampão 9, 23
- célula de fluxo
  - aquisição de imagens 53
  - blocos 51
  - descrição geral 7
  - embalagem 17
  - limpeza 17
  - numeração das pistas 52
  - numeração do blocos 54
  - número da faixa 53
  - pares de pistas 7
  - pinos de alinhamento 21
  - rehibridização 37
  - tipos 1
- ciclos de densidade de clusters 26
- ciclos numa leitura 16
- clusters que passam pelo filtro 49
- compartimento de aquisição de imagens 2-3
- compartimento de reagentes 2

- compartimento de tampão 2
- compartimento do filtro de ar 2-3
- compatibilidade
  - controlo RFID 7
- componentes
  - barra de estado 2
  - compartimento de aquisição de imagens 2-3
  - compartimento de reagentes 2
  - compartimento de tampão 2
  - compartimento do filtro de ar 2
- comprimento da leitura 16
- comprimento de leitura 16
- configuração do ensaio, opção avançada 12
- considerações de indexação 50
- consumíveis
  - água laboratorial 14
  - cartucho de reagentes 7
  - cartucho de tampão 9
  - célula de fluxo 7
  - ensaios de sequenciação 13
  - lavar consumíveis 28-29
  - manutenção do instrumento 13
- consumíveis fornecidos pelo utilizador 13
- criar um ensaio 16

## D

- definições de configuração 43
- diretrizes de água laboratorial 14
- documentação 1, 59
- duração do ensaio 16

## E

- encerrar o instrumento 34
- ensaios
  - criar 16
- erro de armazenamento de rede 42
- erros
  - probabilidade 50
- erros de verificação pré-ensaio 36
- erros e avisos 4

## F

- faseamento 48
- ficheiros de filtros 51
- ficheiros de identificação de bases 51
- ficheiros de saída 51

- ficheiros de saída, sequenciação 51
- ficheiros InterOp 35, 51
- ficheiros locs 51
- filtro de ar 31
- filtro de pureza 49
- fluxo de célula
  - atribuição de nome a ficheiro de imagem 54
- fluxo de trabalho 47
  - cartucho de reagente 23
  - cartucho de reagentes 16
  - cartucho de tampão 23
  - célula de fluxo 21
  - considerações de indexação 50
  - duração do ensaio 16
  - hipoclorito de sódio 29
  - início de sessão do BaseSpace Sequence Hub 19, 39
  - Local Run Manager 19
  - métricas do ensaio 25
  - modo Local Run Manager 20
  - modo manual 20
  - NCS 19
  - opção de carregamento avançado 12
  - porta do compartimento da célula de fluxo 18
  - preparação da célula de fluxo 17
  - reagentes gastos 22
  - verificação pré-ensaio 24
- fluxo de trabalho de sequenciação 47
- formação online 1
- formamida, posição 6 24

## G

- geração de modelos 48
- gerir instrumento
  - encerrar 34

## H

- hipoclorito de sódio, lavagem 29

## I

- ícones
  - erros e avisos 4
  - estado 4
  - minimizar NCS 5
- identificação de bases 49
  - considerações de indexação 50
- imagens miniatura 51

- imagiologia, sequenciação de 2 canais 49
- instrumento
  - arranque 10
  - botão de alimentação 5
  - definições de configuração 43
- intensidades 49
- interruptor de alimentação 10

## L

- lavagem
  - automática 27
  - consumíveis fornecidos pelo utilizador 28
  - lavagem manual 28
  - lavar componentes 28
- lavagem do instrumento 28
- lavagem pós-ensaio 27
- Local Run Manager 20
  - criar um ensaio 16
  - módulos 19
- localização da pasta 20
- localização de clusters 48
  - ficheiros 51

## M

- manutenção do instrumento
  - consumíveis 13
- manutenção preventiva 28
- manutenção, preventiva 28
- Mensagem de erro RAID 42
- métrica
  - identificação de bases 49
- métricas 26
  - ciclos de intensidade 26
- métricas do ensaio 25
- modo de ensaio
  - Local Run Manager 19
  - manual 19
- modo do ensaio
  - manual 20
- modo manual
  - criar um ensaio 16
- módulos, Local Run Manager 19

## N

- nome de utilizador e palavra-passe 10
- nome de utilizador e palavra-passe do sistema 10

numeração das câmaras 53  
numeração das faixas 53  
numeração das pistas 52  
numeração dos blocos 54

## O

opção de carregamento avançado 12

## P

parâmetros do ensaio  
  editar parâmetros 20  
  modo Local Run Manager 20  
  modo manual 20  
pares de pistas 52  
passagem pelo filtro (PF) 49  
pasta de saída 19  
pontuações Q 50  
porta do compartimento da célula de fluxo 18  
pré-faseamento 48  
purgar os consumíveis 13

## R

reagentes  
  eliminação correta 23  
reagentes gastos  
  eliminação 22, 30  
  recipiente cheio 37  
rehibridização de primer 37  
rehibridização, Leitura 1  
  resolução de problemas  
  métricas de baixa qualidade 37  
resolução de problemas  
  ficheiros específicos do ensaio 35  
  opções de contacto 35  
  recipiente de reagentes gastos 37  
  verificação do sistema 40  
  verificação pré-ensaio 36  
RTA v2  
  terminação 46  
RTAv2  
  descrição geral 46  
RunInfo.xml 35, 51

## S

sequenciação 47  
  consumíveis fornecidos pelo utilizador 13

Sequencing Analysis Viewer 15  
Serviço de monitorização Illumina Proactive 12, 44

software  
  análise de imagens, identificação de bases 3  
  atualização automática 33  
  atualização manual 33  
  criar um ensaio 16  
  definições de configuração 43  
  duração do ensaio 16  
  inicialização 10  
  no instrumento 3  
software de atualização 32  
software de controlo 3  
software Real-Time Analysis 1, 3  
  resultados 51

## T

tabelas de qualidade 50  
transferência de dados  
  ícones de atividade 26  
  universal copy service 26  
  Universal Copy Service 26

## U

Universal Copy Service 26

## V

verificação do sistema 40  
verificação pré-ensaio 24

## W

Windows  
  acesso 5  
  palavra-passe 5

# Assistência técnica

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

Sítio Web: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
E-mail: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Números de telefone do Apoio ao Cliente da Illumina

Região	Número gratuito	Regional
<b>América do Norte</b>	+1 800 809 4566	
<b>Alemanha</b>	+49 8001014940	+49 8938035677
<b>Austrália</b>	+1 800 775 688	
<b>Áustria</b>	+43 800006249	+43 19286540
<b>Bélgica</b>	+32 80077160	+32 34002973
<b>China</b>	400 066 5835	
<b>Coreia do Sul</b>	+82 80 234 5300	
<b>Dinamarca</b>	+45 80820183	+45 89871156
<b>Espanha</b>	+34 911899417	+34 800300143
<b>Finlândia</b>	+358 800918363	+358 974790110
<b>França</b>	+33 805102193	+33 170770446
<b>Hong Kong, China</b>	800960230	
<b>Irlanda</b>	+353 1800936608	+353 016950506
<b>Itália</b>	+39 800985513	+39 236003759
<b>Japão</b>	0800 111 5011	
<b>Noruega</b>	+47 800 16836	+47 21939693
<b>Nova Zelândia</b>	0800 451 650	
<b>Países Baixos</b>	+31 8000222493	+31 207132960
<b>Reino Unido</b>	+44 8000126019	+44 2073057197
<b>Singapura</b>	+1 800 579 2745	
<b>Suécia</b>	+46 850619671	+46 200883979
<b>Suíça</b>	+41 565800000	+41 800200442
<b>Taiwan, China</b>	00806651752	
<b>Outros países</b>	+44 1799 534000	

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

Documentação do produto — Disponível para transferência em [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122 EUA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (fora da América do Norte)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

**illumina**<sup>®</sup>