

Tájékoztatófüzet

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA

Rendeltetés

A NovaSeq 6000Dx Instrument célja a perifériás teljes vérből vagy formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetből kivont humán genomikus DNS DNS-könyvtárainak célzott szekvenálása, ha *in vitro* diagnosztikai (IVD) vizsgálatokkal együtt használják. A NovaSeq 6000Dx Instrument nem szolgál a teljes genom szekvenálására vagy de novo szekvenálásra. A NovaSeq 6000Dx Instrument meghatározott regisztrált, tanúsított vagy jóváhagyott IVD reagensekkel és elemzési szoftverrel történő használatra szolgál.

Az eljárás működési elve

Az Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument DNS-könyvtárak szekvenálására szolgál *in vitro* diagnosztikai vizsgálatokkal. A NovaSeq 6000Dx használatához bemenetként DNS-ből elkészített könyvtárak szolgálnak, amelyek amplifikált célkönyvtárakat, mintaindexeket és befogószekvenciákat tartalmaznak. A készülék a mintakönyvtárakat egy áramlási cellában rögzíti, és szintézissel végzett szekvenálás (SBS) kémiai módszerrel szekvenálja. Az SBS során a fluoreszcensen jelölt egyes nukleotidbázisok kimutatása reverzibilis terminációs módszerrel történik, amint azok beépülnek a növekvő DNS-szálakba. A Real-Time Analysis (RTA) szoftver képelemzést és bázisazonosítást végez, és minőségi pontszámot rendel minden bázishoz minden szekvenálási ciklusban. Amikor az elsődleges elemzés befejeződött, a mellékelt és szükséges Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx készülék a másodlagos elemzés során elvégzi a bázisazonosítások feldolgozását. A NovaSeq 6000Dx a másodlagos elemzéshez különböző alkalmazásokat alkalmaz a munkafolyamattól függően. A DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás által végzett feldolgozás részét képezi a demultiplikálás, a FASTQ-fájlok létrehozása, az illesztés, a variánsok azonosítása és a variánsazonosítás-formátum (VCF és gVCF) fájlok létrehozása. A VCF- és gVCF-fájlok a referenciagenom meghatározott helyein található csírvonal- vagy szomatikus variánsokról (a megadott munkafolyamattól függően) tartalmaznak adatokat.

Kettős üzemmód

A NovaSeq 6000Dx egy boot merevlemez-meghajtót tartalmaz külön *in vitro* diagnosztikai (IVD) és kizárólag kutatásra szánt (RUO) üzemmódokkal. A mód kiválasztása a Sequencing (Szekvenálás) képernyőn egy kapcsolóval történik. A kiválasztott üzemmód egyértelműen fel van címkézve az felhasználói felületen minden képernyőn. Az IVD szekvenálási vizsgálatokat, beleértve a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazást, csírvonalbeli és/vagy szomatikus munkafolyamatokban, IVD módban hajtják végre. Csak IVD szekvenálási reagensek használhatók IVD módban. A NovaSeq 6000Dx teljesítményjellemzőit és az eljárás korlátait a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás segítségével, IVD módban állapították meg.

Az eljárás korlátai

1. Kizárólag *in vitro* diagnosztikai használatra.
2. A DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás, ha a NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) reagensekkel együtt használják, képes biztosítani a következőket:
 - Szekvenálási eredmények:
 - $\geq 1,0$ terabázis (TB) az S2 készlettel
 - $\geq 3,0$ TB az S4 készlettel
 - 2 x 150 bázispár (bp) kiolvasási hossz (párosított végű futtatás esetén).
 - A Q30 $\geq 85\%$ -nál magasabb bázisok 2 x 150 bp kiolvasási hosszánál. A bázisazonosítások legalább 85%-ának Phred-skála szerinti minőségi pontszáma 30 feletti, ami 99,9%-nál nagyobb bázisazonosítási pontosságot jelez.
3. A > 18 bp hosszúságú inzerciók és a > 21 bp hosszúságú törlések nem lettek validálva.
4. A nagy variánsok, beleértve a több nukleotidból álló variánsokat (MNV-k), és a nagy indelek a kimeneti VCF-fájlban különálló kisebb variánsokként szerepelhetnek.
5. A kis MNV-eket külön variánsként jelentik a kimeneti VCF fájlban.
6. A VCF fájlban a deléciók jelentése a VCF formátum szerinti megelőző bázis koordinátáján történik. Ezért vegye figyelembe a szomszédos variánsokat, mielőtt azt leletezné, hogy egy egyedi bázisazonosítás homozigóta referencia.
7. Csak a csíravonal munkafolyamatra vonatkozó korlátozások:
 - A DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csíravonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatát alkalmazó NovaSeq 6000Dx készüléket úgy tervezték, hogy kvalitatív eredményeket adjon csíravonalvariáns azonosításához (pl. homozigóta, heterozigóta, vad típusú).
 - A kópiaszám befolyásolhatja, hogy egy variáns homozigótaként vagy heterozigótaként kerül azonosításra.
 - A rendszer egyetlen lókuszon nem jelenít meg két variánsnál többet, még a kópiaszám változása esetén sem.
8. Csak a szomatikus munkafolyamatra vonatkozó korlátozások:
 - A DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás Szomatikus FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatát alkalmazó NovaSeq 6000Dx készüléket úgy tervezték, hogy kvalitatív eredményeket adjon a szomatikus variáns azonosításához (azaz szomatikus variáns jelenléte esetén).

- A Szomatikus FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamat nem képes különbséget tenni a csírvonal és a szomatikus variánsok között. A munkafolyamat a gyakoriságok nagy tartományában előforduló variánsok kimutatására szolgál, a variáns gyakorisága azonban nem használható a szomatikus és a csírvonalbeli variánsok elkülönítésére.
- A mintában található egészséges szövetek befolyásolják a variánsok kimutatását. Az említett kimutatási határérték a daganatos szövetből és az egészséges szövetből kivont variáns és normál DNS gyakorisága közötti arányon alapul.
- Ha egynél több variáns allélt azonosítanak ugyanabban a lókuszbán, egyik allél sem lesz sikeres variánsként jelölve. Ehelyett az allélok teljes készlete jelentésre kerül, de szűrésre kerül a multiallelikális címke segítségével.

Minőség-ellenőrzési eljárások

A NovaSeq 6000Dx szoftver minden egyes futtatást, mintát és bázisazonosítást értékeli a minőség-ellenőrzési mérőszámok alapján. Ajánlott a könyvtár-előkészítés során a pozitív és negatív kontrollok használata, és ezek eredményét értékelni kell. A kontrollok értékelése az alábbi.

- Negatív kontroll (templát nélküli kontroll) vagy egyéb negatív kontroll—A várt eredményt kell adnia. Ha a negatív kontroll a várttól eltérő eredményt ad, akkor lehetséges, hogy a mintakövetés hibája, az indexprimerek helytelen rögzítése vagy szennyeződés történt.
- Pozitív kontrollminta—A várt eredményt kell adnia. Ha a pozitív kontroll a várttól eltérő eredményt ad, akkor lehetséges, hogy a mintakövetés hibája vagy az indexprimerek helytelen rögzítése történt.

A termék összetevői

Az Illumina NovaSeq 6000Dx a következőkből áll:

1. NovaSeq 6000Dx Instrument (Cikkszám: 20068232)
2. A NovaSeq 6000Dx Instrument készülékhez való szoftverkomponensek közé tartoznak az alábbiak:

| Szoftveralkalmazás | Telepítési hely | Beosztás | Leírás |
|------------------------|-----------------|----------------------------------|--|
| NovaSeq kezelőszoftver | NovaSeq 6000Dx | A készülék működésének vezérlése | A NovaSeq kezelőszoftver (NVOS) irányítja a készülék működését a szekvenálás során, és képeket készít a Real-Time Analysis (RTA) szoftver számára. |

| Szoftveralkalmazás | Telepítési hely | Beosztás | Leírás |
|-----------------------------------|------------------------|--|---|
| Real-Time Analysis szoftver (RTA) | NovaSeq 6000Dx | Az elsődleges elemzés elvégzése | Az RTA szoftveralkalmazás a NVOS által minden szekvenálási futtatási ciklusban minden csempéről készült képet bázisazonosítási fájlakká alakít. A bázisazonosító fájl az alkalmazásmodulok bemenetei a Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx szerveren. Az RTA szoftveralkalmazás nem tartalmaz felhasználói felületet. |
| Illumina Run Manager | Illumina DRAGEN Server | Vezérlők futtatásának beállítása és kezelése | Az Illumina Run Manager szerver felhasználó- és műszerkezelést biztosít, hosztolja az alkalmazásszoftvert és lehetővé teszi a DRAGEN hardvergyorsított genomika másodlagos elemzési moduljainak használatát. |

Működési feltételek

A működési feltételekkel kapcsolatos további információkért lásd a(z) *NovaSeq 6000Dx Instrument termékdokumentációja* készülék Környezeti feltételek című szakaszát.

| Elem | Műszaki adatok |
|--------------|--|
| Hőmérséklet | 19 °C és 25 °C (22 °C ± 3 °C) közötti hőmérsékletet tartson fenn a laborban. Ez a hőmérséklet a készülék üzemi hőmérséklet-tartományát jelenti. Biztosítsa, hogy a futtatások során a környezeti hőmérséklet ne változhasson ± 2 °C-nál nagyobb mértékben. |
| Páratartalom | A labor relatív páratartalma 20 és 80% között legyen. A rendszert 2000 méteres vagy annál alacsonyabb üzemi magasságban kell üzemeltetni. |

Fogyóeszközök és berendezés

Ez a rész felsorol minden szükséges információt a NovaSeq 6000Dx szekvenálási futtatáshoz. Ide tartoznak az Illumina által biztosított fogyóeszközök, valamint a kiegészítő fogyóeszközök és berendezések, amelyeket más beszállítóktól kell beszereznie. Ezekre a tételekre a protokoll teljesítéséhez, valamint a karbantartási és hibaelhárítási eljárások elvégzéséhez van szükség.

A fogyóeszközökön vagy a fogyóeszközök csomagolásán található szimbólumokkal kapcsolatos információkért lásd: [Illumina IVD szimbólumkulcs \(dokumentumszám: 1000000039141\)](#).

Szekvenálási fogyóeszközök

A NovaSeq 6000Dx futtatásához az alábbi összetevők szükségesek:

- Pufferkazetta
- Klaszterkazetta
- Áramlási cella
- Könyvtárcémcső
- SBS-kazetta

A NovaSeq 6000Dx fogyóeszközök a következő konfigurációkban vannak csomagolva. Mindegyik komponens rádiófrekvenciás azonosítást (RFID) használ a fogyóeszközök pontos nyomon követése és kompatibilitása érdekében.

1 táblázat Illumina által beszerzett fogyóeszközök

| Készlet neve | Tartalom | Illumina Cikkszám |
|---|---|-------------------|
| NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) | S2 Klaszterkazetta S2 áramlási cella S2 SBS-kazetta | 20046931 |
| NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) | S4 klaszterkazetta S4 áramlási cella S4 SBS-kazetta | 20046933 |
| NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge | S2 pufferkazetta | 20062292 |
| NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge | S4 pufferkazetta | 20062293 |
| NovaSeq 6000Dx Library Tube | Egydarabos könyvtárcémcső | 20062290 |
| NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 db-os csomag | 24 darabos könyvtárcémcső | 20062291 |

Amikor megkapja a fogyóeszközöket, azonnal tárolja az összetevőket a jelzett hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt.



2 táblázat NovaSeq 6000Dx készlet tárolása

| Fogyóeszköz | Darab | Tárolási hőmérséklet | Hossz | Szélesség | Magasság |
|-----------------|-------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Áramlási cella | 1 | 2 °C és 8 °C között | 27,7 cm (10,9 hüvelyk) | 17 cm (6,7 hüvelyk) | 3,8 cm (1,5 hüvelyk) |
| Klaszterkazetta | 1 | -25 °C és -15 °C között | 29,5 cm (11,6 hüvelyk) | 13 cm (5,1 hüvelyk) | 9,4 cm (3,7 hüvelyk) |
| SBS-kazetta | 1 | -25 °C és -15 °C között | 30 cm (11,8 hüvelyk) | 12,4 cm (4,9 hüvelyk) | 11,2 cm (4,4 hüvelyk) |
| Pufferkazetta | 1 | 15 °C és 30 °C között | 42,2 cm (16,6 hüvelyk) | 20,6 cm (8,1 hüvelyk) | 21,1 cm (8,3 hüvelyk) |
| Könyvtárkémcső | 1 | 15 °C és 30 °C között | 4,1 cm (1,6 hüvelyk) | 2,3 cm (0,9 hüvelyk) | 12,4 (4,9 hüvelyk) |

Fogyóeszközök adatai

A kompatibilis készletkomponensek azonosításához az áramlási cellákat és kazettákat a készlet üzemmódját jelző szimbólumokkal jelölik.

3 táblázat Kompatibilitást jelző feliratok

| Készlet üzemmód | Címkén található jelzés | Leírás |
|---------------------------|---|---|
| Az S2 készlet komponensei |  | Az S2 áramlási cella akár 4,1 milliárd egyszeres szűrőn átjutó beolvasást generál 2 x 150 bp-nál akár 1000 Gb teljesítménnyel. Az S2 áramlási cella gyors szekvenálást biztosít a legtöbb nagy teljesítményű alkalmazásnál. |
| Az S4 készlet komponensei |  | Az S4 áramlási cella akár 10 milliárd egyszeres szűrőn átjutó beolvasást generál 2 x 150 bp-nál akár 3000 Gb teljesítménnyel. Az S4 áramlási cella az áramlási cella négysávós változata, a maximális kimenetre tervezve. |

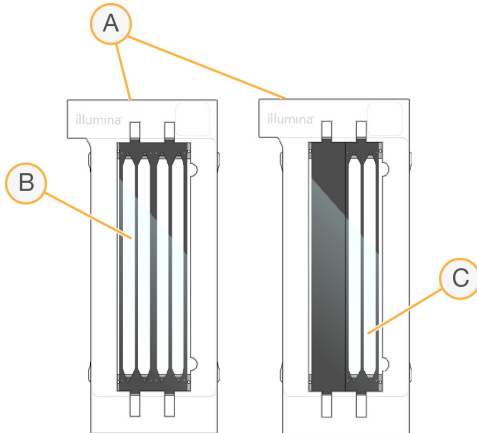
Áramlási cella

A NovaSeq 6000Dx áramlási cella egy kazettában lévő mintázott áramlási cella. Az áramlási cella egy üvegalapú szubsztrát, amely több milliárd nanoüreget tartalmaz meghatározott elrendezésben. A nanoüregekben klaszterek jönnek létre, amelyekből aztán elvégezhető a szekvenálás.

Mindegyik áramlási cella több sávot tartalmaz az egyesített könyvtárak szekvenálásához. Az S2 áramlási cella két sávval, az S4 áramlási cella pedig négy sávval rendelkezik. Mindegyik sávról több rendben készül felvétel, és a szoftver ezután minden rend képét kisebb részekre osztja, úgynevezett mozaikokra.

Az áramlási cella egyes karcolásai és egyéb kisebb kozmetikai hibái normális jelenségek, és várhatóan nem veszélyeztetik az adatminőséget és a hozamot. Az Illumina azt javasolja, hogy ezeket az áramlási cellákat a normális módon használja.

1 ábra Áramlási cellák



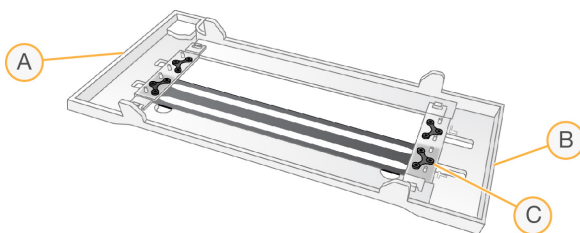
- A. Áramlási cella kazettája
- B. Négysávós áramlási cella (S4)
- C. Kétsávós áramlási cella (S2)

Az egyes áramlási cellák alja több tömítéssel rendelkezik. Könyvtárak és reagensek lépnek be az áramlási cella sávjaiba az áramlási cella bemeneti végén lévő tömítéseken keresztül. A használt reagensek a kiömlő végen lévő tömítéseken keresztül távoznak a sávokból.

**FIGYELEM!**

Ne érintse meg a tömítéseket az áramlási cella kezelésekor.

2 ábra Invertált áramlási cella



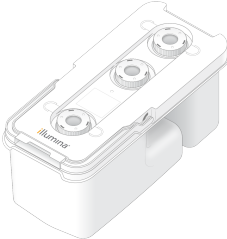


- A. Kimeneti vég
- B. Bemeneti vég
- C. Tömítés (az egyik a négyből)

Puffer, klaszter és SBS kazetta adatai

A NovaSeq 6000Dx puffer, a klaszter és az SBS kazetták fóliázárású tartályokkal rendelkeznek, amelyek reagensekkel, pufferekkel és mosóoldattal előre meg vannak töltve. A NovaSeq 6000Dx reagenskészletek tartalmazzák a klaszter és SBS kazettákat. A pufferkazetta külön kapható.

A kazettákat közvetlenül a készülékbe kell tölteni, és színkódoltak és fel vannak címkézve a betöltési hibák csökkentése érdekében. A reagenshűtő és a pufferfiókok vezetőelemei biztosítják a megfelelő tájolást.

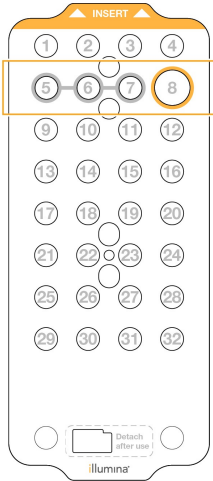
4 táblázat NovaSeq 6000Dx kazetták

| Fogyóeszköz | Leírás |
|---|--|
|  <p>Pufferkazetta</p> | <p>Előre meg van töltve szekvenálási pufferekkel, és legfeljebb 6,8 kg (15 font) tömegű. A műanyag fogantyú megkönnyíti a szállítást, a betöltést és a kivételt.</p> <p>A pufferkazetta fényérzékeny reagenseket tartalmaz. A puffertartályokat csak közvetlenül a felhasználás előtt vegye ki a csomagolásukból.</p> |
|  <p>Klaszterkazetta</p> | <p>Előre feltöltve klaszterező, indexelő és páros végű reagensekkel és mosóoldattal. Tartalmaz egy kijelölt pozíciót a könyvtárkémcsőhöz. A narancssárga címke megkülönbözteti a klaszterkazettát az SBS-kazettától.</p> <p>A 30. pozícióban lévő denaturációs reagens formamidot tartalmaz, amely egy szerves amid és reprodukív toxin. A fel nem használt reagensek szekvenálási futtatás utáni biztonságos ártalmatlanításának elősegítése érdekében ez a tároló eltávolítható.</p> |
|  <p>SBS kazetta</p> | <p>Előre meg van töltve szekvenálási reagensekkel a készlet által támogatott ciklusszámra jellemző mennyiségben. Mindhárom reagenspozíció mellett egy-egy szomszédos pozíció van fenntartva az automatikus futtatás utáni mosáshoz. A szürke címke megkülönbözteti az SBS kazettát a klaszterkazettától.</p> <p>Az SBS kazetta fényérzékeny reagenseket tartalmaz. Az SBS tartályokat csak közvetlenül a felhasználás előtt vegye ki a csomagolásukból.</p> |

Fenntartott klaszterkazetta-tartályok

Három tartály van fenntartva az egyéni primereknek, és egy üres pozíció van fenntartva a könyvtárkémcső számára. A minta nyomon követhetősége érdekében a könyvtárkémcső a futtatás beállítása során betöltődik a klaszterkazettába, és a futtatás végéig a kazettában marad.

3 ábra Számozott tárolók



5 táblázat Klaszterkazetta-tartályok

| Elhelyezkedés | Lefoglalva ezekhez |
|---------------|----------------------------|
| 5, 6 és 7 | Opcionális egyéni primerek |
| 8 | Könyvtárkémcső |

A felhasználó által beszerzett fogyóeszközök és berendezések

6 táblázat Fogyóeszközök

| Fogyóeszköz | Beszállító | Cél |
|--|---|---|
| Centrifugaüveg, 500 ml | Általános laboratóriumi beszállító | Tween 20 hígítása a karbantartási mosáshoz. |
| Centrifugacső, 30 ml | Általános laboratóriumi beszállító | NaOCI hígítása karbantartási mosáshoz. |
| Eldobható, hintőpormentes kesztyűk | Általános laboratóriumi beszállító | Általános cél. |
| 70%-os izopropil-alkohollal átítatott törülközők vagy Etanolos alkoholos törülközők, 70% | VWR, cikkszám: 95041-714 vagy ezzel egyenértékű Általános laboratóriumi beszállító | Az alkatrészek tisztítása futtatás előtt és általános célból. |

| Fogyóeszköz | Beszállító | Cél |
|--|---|---|
| Szöszmentes laboratóriumi törülköző | VWR, cikkszám: 21905-026 vagy ezzel egyenértékű | Az áramlási cella munkafolyamata alatt és általános célból. |
| Reagens minőségű NaOCl, 5% | Sigma-Aldrich, cikkszám: 239305 | Karbantartási mosás elvégzése. |
| Pipettahegyek, 2 µl | Általános laboratóriumi beszállító | Pipettázás a könyvtárak hígításához és betöltéséhez. |
| Pipettahegyek, 20 µl | Általános laboratóriumi beszállító | Pipettázás a könyvtárak hígításához és betöltéséhez. |
| Pipettahegyek, 200 µl | Általános laboratóriumi beszállító | Pipettázás a könyvtárak hígításához és betöltéséhez. |
| Pipettahegyek, 1000 µl | Általános laboratóriumi beszállító | Pipettázás a könyvtárak hígításához és betöltéséhez. |
| Reagens vagy spektrofotometriás minőségű izopropil-alkohol (99%), 100 ml-es üveg | Általános laboratóriumi beszállító | Az optikai alkatrészek rendszeres tisztítása és az objektívtisztító kazetta támogatása. |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, katalógusszám: P7949 | Karbantartási mosás elvégzése. |
| Laboratóriumi minőségű víz | Általános laboratóriumi beszállító | Tween 20 és nátrium-hipoklorit hígítása karbantartási mosáshoz. |

7 táblázat Berendezés

| Elem | Forrás |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Fagyasztó, -25 °C és -15 °C között | Általános laboratóriumi beszállító |
| Mérőhenger, 500 ml, steril | Általános laboratóriumi beszállító |
| Jégvödör | Általános laboratóriumi beszállító |
| Pipetta, 20 µl | Általános laboratóriumi beszállító |
| Pipetta, 200 µl | Általános laboratóriumi beszállító |
| Pipetta, 1000 µl | Általános laboratóriumi beszállító |
| Hűtőszekrény, 2 °C és 8 °C között | Általános laboratóriumi beszállító |
| Kémcső, vízfürdők* | Általános laboratóriumi beszállító |

* Használjon olyan tartályt, amely képes két reagenskazetta befogadására és a megfelelő vízszint elérésére. Például (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm) (24 hüvelyk × 36 hüvelyk × 10 hüvelyk).

A laboratóriumi minőségű vízzel kapcsolatos útmutatás

A készülékkel kapcsolatos eljárásokhoz mindig laboratóriumi minőségű vizet vagy ionmentes vizet használjon. Soha ne használjon csapvizet. Csak a következő típusú vagy azzal egyenértékű minőségű vizet használjon:

- Ionmentes víz
- Illumina PW1
- 18 megaohm (MΩ) ellenállású víz
- Milli-Q víz
- Super-Q víz
- Molekuláris biológiai minőségű víz

Használati útmutató

A következő utasítások a NovaSeq 6000Dx Instrument IVD üzemmódban történő futtatására vonatkoznak, S2 vagy S4 készletkonfigurációk használatával.

Szekvenálási futtatás létrehozása

Az alábbi lépésekkel hozhat létre futtatást az Illumina Run Manager segítségével IVD vagy RUO módban. Másik lehetőségként válassza az **Import Run** (Futtatás importálása) lehetőséget a Runs (Futtatások) oldal Planned (Tervezett) lapján, és importáljon egy mintalapot. Új futtatások létrehozása a készüléken vagy az Illumina Run Manager hálózatba kötött számítógép böngészőjével végzett eléréssel.

MEGJEGYZÉS Az egyes elemzési alkalmazások által igényelt pontos információk eltérőek, de a futtatás létrehozásának folyamata a következő lépéseket tartalmazza.

1. A Runs (Futtatások) képernyő Planned (Tervezett) lapján válassza a **Create Run** (Futtatás létrehozása) lehetőséget.
2. Válasszon ki egy alkalmazást, majd kattintson a **Next** (Következő) gombra.
3. Lépegetsen végig a beállítási képernyőkön. Az alkalmazástól függően a megjelenített képernyők a következőket tartalmazhatják:
 - **Run Settings** (Futtatási beállítások)—Írja be a futtatási paramétereit.
 - **Sample Data** (Mintaadatok)—Írja be a mintaadatokat manuálisan vagy a mintaadatokat tartalmazó CSV-fájl importálásával. A mintaneveknek egyedinek kell lenniük.
 - **Analysis Settings** (Elemzési beállítások)—Írja be az elemzés beállításait.
4. A Review (Áttekintés) képernyőn tekintse át a futtatási információkat, és nyomja meg a **Save** (Mentés) gombot.
A futtatás bekerül a futtatások listájának tetejére a Planned (Tervezett) lapon.

Fogyóeszközök előkészítése

Az SBS- és klaszterkazetták kiolvasztása

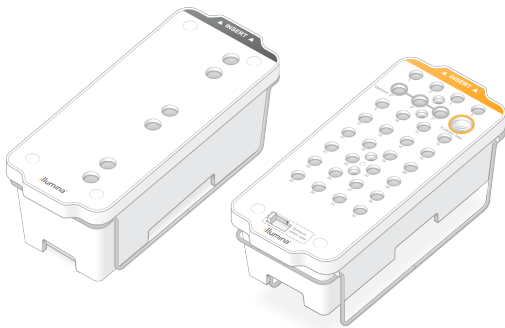


FIGYELEM!

Ha forró vizet használ a reagensek kiolvasztásához, az az adatok minőségének csökkenését vagy futtatási hibát okozhat.

1. Ha szekvenálási futtatás van folyamatban, győződjön meg arról, hogy a műszer mindkét oldala rendelkezésre áll, amikor a kiolvasztás befejeződött.
2. Vegye ki az SBS- és klaszterkazettákat a -25 °C és -15 °C közötti tárolóból.
3. Helyezze az egyes kazettákat a kiolvasztó drótállványra. Az állványok a műszerhez vannak mellékelve, és megakadályozzák a felborulást a vízfürdőben.

4 ábra Kazetták a kiolvasztó drótállványon



4. A kiolvasztás időtartamának meghatározásához használja a következő táblázatot. Olvassa fel az SBS-t és a klaszterkazettákat szobahőmérsékletű ($19\text{--}25\text{ °C}$ -os) vízfürdőben az alábbiak szerint. A kazettákat körülbelül félig merítse alá.

| Kazetta | Kiolvasztás időtartama |
|--------------------|------------------------|
| S2 SBS-kazetta | 4 óra |
| S2 klaszterkazetta | Max. 2 óra |
| S4 SBS-kazetta | 4 óra |
| S4 Klaszterkazetta | Max. 4 óra |



FIGYELEM!

Ha a reagensekazetták kiolvasztásától számított négy órán belül nem kezdi meg a szekvenálást, az az adatok minőségének csökkenését eredményezheti.

- Papírtörölővel alaposan szárítsa meg a kazettaalapokat. Szárítsa meg az üregek között, hogy az összes vizet eltávolítsa.
- Ellenőrizze, hogy a zárófoliák nem tartalmazzak-e vizet. Ha víz van jelen, törölje szárazra egy szöszmentes kendővel.
- Vizsgálja meg minden kazetta alját, és győződjön meg arról, hogy a tartalma jégmentes, ami azt jelzi, hogy a reagensek kiolvadtak.
- Fordítsa át 10-szer a kazettákat, hogy a reagensek összekeveredjenek.

**FIGYELEM!**

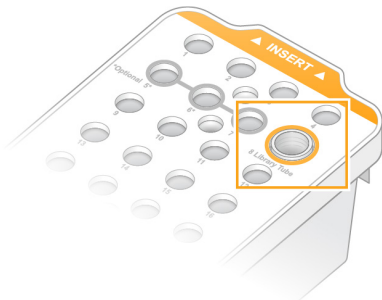
A kazetták alapos átfogatásának elmulasztása az adatok minőségének csökkenését eredményezheti.

- Óvatosan ütögesse a kazetták alját az asztalhoz, hogy csökkentse a légbuborékok mennyiségét.

Könyvtárkémcső betöltése

- A könyvtár alsó részének zavarása nélkül helyezze be a denaturált és hígított könyvtárcsoportot tartalmazó kupak nélküli könyvtárkémcsövet a klaszterkazetta **Library Tube** (könyvtárkémcső) pozíciójába (#8).
- Helyezze be a könyvtárkémcsövet a klaszterkazetta 8. pozíciójába.

5 ábra Kupak nélküli könyvtárkémcső betöltve a 8. pozícióba

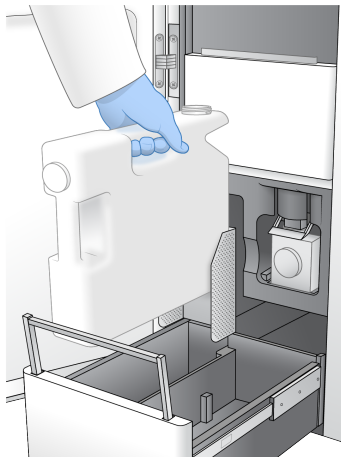
**Használtreagens-palackok kiürítése**

A következő utasítások segítségével ürítse ki a használtreagens-palackokat *minden* szekvenálási futtatásnál. Ha a rendszer úgy van konfigurálva, hogy a használt reagenseket külső helyre vezesse el, a kis méretű palack összegyűjti a használt reagenseket, és minden szekvenálási futtatásnál ki kell üríteni őket. A nagy méretű palacknak a helyén kell lennie.

- Távolítsa el és ürítse ki a kis méretű használtreagens-palackot az alábbiak szerint.
 - Emelje fel a kart, és vegye ki a kisméretű használtreagens-palackot a fülkéből. Fogja meg az üveget az oldalán.
 - Távolítsa el a menetes kupakot a palack elején lévő kupaktartóról.

- c. Zárja le a palack nyílását a kupakkal, hogy elkerülje a kiömlést.
 - d. Ennek tartalmát tartsa elkülönítve a másik palack tartalmától, és az adott régió vonatkozó szabványainak megfelelően selejtezze le.
 - e. Helyezze vissza a kupak nélküli palackot a fülkébe, majd engedje le a szintet. Tárolja a kupakot a kupaktartón.
2. Távolítsa el és ürítse ki a nagy méretű használtreagens-palackot az alábbiak szerint.
- a. A felső fogantyú segítségével vegye ki a nagy méretű használtreagens-palackot a pufferfiók bal oldali részéről.
 - b. Távolítsa el a menetes kupakot a palack elején lévő kupaktartóról.
 - c. Zárja le a palack nyílását a kupakkal, hogy elkerülje a kiömlést.
 - d. Tartalmát az adott régióra vonatkozó szabványoknak megfelelően ártalmatlanítsa. Ürítéskor fogja meg mindkét fogantyút.
 - e. Helyezze vissza a kupak nélküli palackot a pufferfiókba. Tárolja a kupakot a kupaktartón.

6 ábra Az üres palack visszajuttatása



3. Vegyen fel egy pár új, hintőpormentes kesztyűt.



FIGYELEM!

A használtreagens-palack kezelése után mindig vegyen fel új pár kesztyűt.

4. Csukja be a pufferfiókot, majd csukja be a folyadékrekesz ajtóit.



FIGYELEM!

A használtreagens-palackok kiürítésének elmulasztása megszakíthatja a futtatást és túlfolyást eredményezhet, ami károsítja a műszert, és biztonsági kockázatot jelent.

Az áramlási cella előkészítése

1. Vegyen ki egy új doboz áramlási cellát tartalmazó csomagot a 2–8 °C-os tárolóból.
2. Tegye félre a lezárt áramlási cella csomagolását környezeti hőmérsékleten (19–25 °C-on) 10–15 percre. Az áramlási cellát a csomagolásból való kivételtől számított 12 órán belül fel kell használni.

A fogyóeszközök betöltése

A futtatási beállítások elindításához és a fogyóeszközök betöltéséhez kövesse az alábbi utasításokat.

1. A főmenüben válassza a **Sequence** (Szekvenálás) menüpontot, majd válasszon ki egyszeres vagy kettős áramláscella-futtatást a következők szerint.
 - **A+B**—Kettős áramláscella-futtatás beállítása.
 - **A**—Az A oldalon egyszeres áramláscella-futtatás beállítása.
 - **B**—A B oldalon egyszeres áramláscella-futtatás beállítása.A rendszer elindítja a futtatás beállítását, az áramlási cella betöltésével kezdve.
2. A figyelmeztetés nyugtázásához és az áramlási cella ajtajának kinyitásához nyomja meg az **OK** gombot.



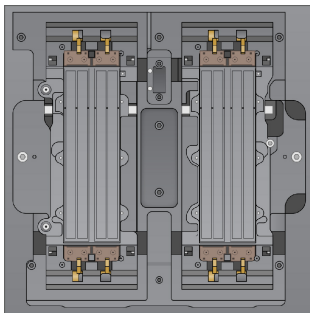
FIGYELEM!

Tartsa tisztán a felületet a szekvenálási futtatás alatt, és ne dőljön a készüléknek. Az áramlási cella ajtajára ható nyomás miatt az kinyílhat, ami leállítja a futtatást. Leállított futtatásokat nem lehet folytatni.

Az áramlási cella behelyezése

1. Ha van, távolítsa el az áramlási cellát az előző futtatásból.
2. Ha részecskék láthatók az áramlási cella emelvényén, tisztítsa meg a teljes szakaszt, beleértve a folyadék interfészt és az optikai illesztési cél üvegfelületét alkoholos törölkendővel. Szárítsa meg szöszmentes kendővel.

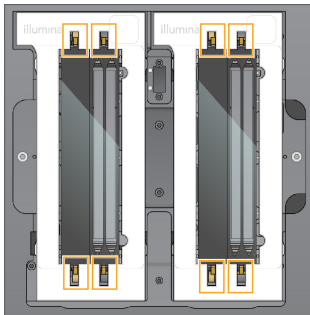
7 ábra Áramlási cella emelvénye



3. Vegye ki az áramlási cellát a csomagolásból az alábbiak szerint.

- a. Vegyen fel egy új pár púdermentes kesztyűt, hogy elkerülje az áramlási cella üvegfelületének szennyeződését.
 - b. A csomagot sík felületen tartva húzza le a fóliát a sarki fül felől.
 - c. Távolítsa el az áramlási cellát fedő átlátszó műanyag rögzítőt.
 - d. Vegye ki az áramlási cellát a csomagolásból. Fogja meg az áramlási cellát az oldalainál, hogy elkerülje az üveg vagy az alsó tömítések megérintését.
 - e. Ha az üvegfelületek bármelyikén részecskék láthatók, tisztítsa meg a megfelelő felületet szőszmentes alkoholos törölkendővel, és szárítsa meg egy alacsony szősztartalmú laboratóriumi kendővel.
 - f. A csomagot megfelelő módon dobja ki.
4. Illessze az áramlási cellát a négy kiemelkedő csavarra, és helyezze az áramlási cella emelvényére.

8 ábra Betöltött áramlási cellák a bilincsek fölé igazítva



5. Válassza a **Close Flow Cell Door** (Áramlási cella ajtajának bezárása) lehetőséget. Az áramlási cella ajtaja bezáródik, a rendszer ellenőrzi az érzékelőket és az RFID-t, és az áramlási cella azonosítója megjelenik a képernyőn.

Töltse be az SBS- és a klaszterkazettákat

1. Nyissa ki a folyadékrekesz ajtaját, majd nyissa ki a reagenshűtő ajtaját.
2. Távolítsa el a használt SBS-t és a klaszterkazettát, ha maradt az előző futtatásból. A használt kazetták átszűrt fóliazárással rendelkeznek.
3. Ártalmatlanítsa a fel nem használt összetevőket a hatályos előírásoknak megfelelően. A klaszterkazetta 30. pozíciójának biztonságos ártalmatlanításához lásd a [30. leválasztási pozíció a\(z\) 21. oldalon](#) című pontot.

4. Töltse be az előkészített kazettákat a reagenshűtő fiókba a következők szerint, hogy az Insert (Beillesztés) címkék a készülék hátoldala felé nézzenek.
 - Helyezze az SBS-kazettát (szürke címke) a bal oldali pozícióba.
 - Helyezze a kupak nélküli könyvtárcémcsövet tartalmazó klaszterkazettát (narancssárga címke) a jobb oldali pozícióba.

9 ábra A reagenskazetta behelyezése

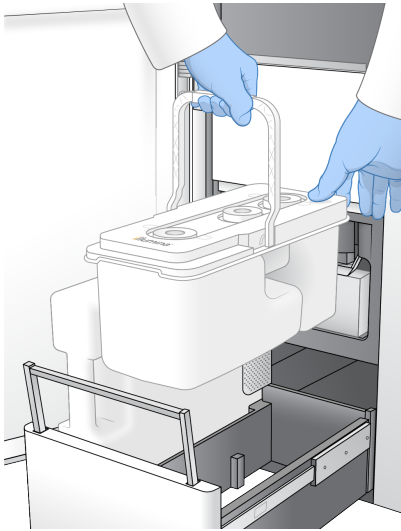


5. Csúsztassa a fiókot a hűtőbe, és zárja be a reagenshűtő ajtaját. Ellenőrzik az érzékelőket és az RFID-eket. A könyvtárcémcső és a két kazetta azonosítója megjelenik a képernyőn.

A pufferkazetta behelyezése

1. Húzza meg a fém fogantyút a pufferfiók kinyitásához.
2. Távolítsa el a használt pufferkazettát a pufferfiók jobb oldaláról. A használt pufferkazetta átszúrt fóliazárással rendelkezik.
3. Helyezzen egy új pufferkazettát a pufferfiókba úgy, hogy az Illumina címkéje a fiók eleje felé nézzen. Igazítsa a kazettát a fiók alján és oldalain lévő megemelt vezetősínekhez. Megfelelő betöltés esetén a pufferkazetta egyenletesen illeszkedik, és a fiók bezáródhat.

10 ábra A pufferkazetta behelyezése



4. Ha mindkét használtreagens-palackot kiürítette, jelölje be azt a jelölőnégyzetet, amellyel nyugtázza, hogy mindkét használtreagens-palack üres.

MEGJEGYZÉS A használtreagens-palackok kiürítésének elmulasztása megszakíthatja a futtatást és túlfolyást eredményezhet, ami károsítja a műszert, és biztonsági kockázatot jelent.

5. Ha hozzáadott fogyóeszközöket, a folytatáshoz válassza a **Run Selection** (Futtatás kiválasztása) lehetőséget.

Futtatás kiválasztása és indítása

A készülék beolvassa a könyvtárképcső azonosítóját, és megkeresi az egyező tervezett futtatást.

1. Ha a könyvtárképcső azonosítójának megfelelő tervezett futtatást talál a rendszer az egyes használt oldalakhoz, akkor a futtatás kiválasztása kimarad. A folytatáshoz válassza a **Review** (Áttekintés) lehetőséget.
2. Ha egyik vagy bármelyik oldalon nincs egyező futtatás, válassza a **Run Selection** (Futtatás kiválasztása) lehetőséget, majd válasszon ki egy vagy több tervezett futtatást. Ugyanaz a tervezett futtatás nem választható ki mindkét oldalon.
3. Egy vagy több futtatás kiválasztásakor válassza a **Pre-Run Checks** (Futtatás előtti ellenőrzések) lehetőséget.
4. Várjon körülbelül 5 percet, hogy a futtatás előtti ellenőrzés befejeződjön. Ha az ellenőrzés sikeresen befejeződött, a futtatás automatikusan elindul.

MEGJEGYZÉS A merevlemez túltöltésének elkerülése érdekében a futtatás megkezdése után ne másoljon semmilyen adatot a C:\ mappába.

A futtatás előtti ellenőrzés hibái

1. Ha a futtatás előtti ellenőrzések érzékelőhiba miatt sikertelenek, például az áramlási cella nem észlelhető, ki kell lépnie, és újra kell indítania a munkafolyamatot.
2. Egyéb futtatás előtti sikertelen ellenőrzés esetén válassza a **Retry** (Újrapróbálkozás) lehetőséget a sikertelen ellenőrzés újraindításához, vagy a **Retry All** (Összes újrapróbálása) lehetőséget az összes ellenőrzés újraindításához.
A hibákat meg kell oldani a futtatás megkezdése előtt.
3. A hiba részleteinek megtekintéséhez válassza az **Error** (Hiba) ikont.
4. Ha az illesztés ellenőrzése sikertelen, a következő módon oldja meg a hibát.
 - a. Válassza a **Reload** (Újratöltés) lehetőséget, majd az **OK** gombot a Load (Betöltés) képernyőre való visszatéréshez.
 - b. Távolítsa el minden elemet a készülék tetejéről, majd válassza az **OK** gombot. Kinyílik az áramlási cella ajtaja.
 - c. Töltse be újra az áramlási cellát, majd válassza a **Run Setup** (Futtatás beállítása) lehetőséget.
 - d. Az egyes RFID-k újraolvasásához és a Pre-Run Checks (Futtatás előtti ellenőrzések) képernyőre való visszatéréshez haladjon végig minden képernyőn.
 - e. Ismétlje meg az ellenőrzést.

A futtatás előrehaladásának nyomon követése






A következő adatok jelennek meg a Sequencing (Szekvenálási) képernyőn, miközben a futtatás folyamatban van. A Sequencing (Szekvenálási) képernyő a főmenüből érhető el.

- **Status of individual run steps** (Az egyes futtatási lépések állapota)
- **Time to completion** (Befejezésig eltelt idő)—A futtatás befejezésének dátuma és időpontja (éééé. hh. nn. óó:pp).
- **Run progress** (Futtatás előrehaladása)—Az aktuális futtatási lépés. A folyamatjelző sáv mérete nem arányos az egyes lépések elvégzésének idejével.
- **Q-Scores** (Q-pontszám)—A minőségi pontszámok (Q-pontszámok) eloszlása.
- **Intensity** (Intenzitás)—Az egyes mozaikok 90. percentilisének klasztersűrűsége. A grafikon színei a piros és zöld csatornákat jelzik.
- **Clusters Passing Filter (%)** (A szűrőn átmenő klaszterek)—A szűrőn átment klaszterek százalékos aránya.
- **Projected Total Yield (GB)** (Tervezett teljes hozam (GB))—Az áramláscella-futtatás várható hozama. Ha a soronkénti mérőszámokat választja ki (H), a megjelenített számok az aktuális soronkénti hozamot jelentik, és ciklusonként frissülnek a futtatás során.
- **Q30**—A futtatás azon bázisazonosításainak százalékos aránya, amelyek Q-pontszáma ≥ 30 .

Állapotjelző ikonok

Az NVOS kezelőfelületen lévő állapotikon jelzi a futtatás állapotát. Az ikonon látható szám jelzi az adott állapothoz tartozó körülmények számát.

Amikor a futtatás állapota megváltozik, az ikon villog. Az állapot leírásának megtekintéséhez kattintson az ikonra. Válassza az **Acknowledge** (Nyugtázás) lehetőséget az üzenet törléséhez, majd válassza a **Close** (Bezárás) ikont a párbeszédpanel bezárásához.

| Állapotjelző ikon | Állapot neve | Leírás |
|---|-------------------------|--|
|  | Állapot rendben | A rendszer normálisan működik. |
|  | Feldolgozás folyamatban | A rendszer feldolgozást végez. |
|  | Vigyázat! | Riasztás történt, ami figyelmet igényel. A figyelmeztetések nem állítják le a futtatást, és nem igényelnek beavatkozást a folytatáshoz. |
|  | Hiba | Hiba történt. A hibák beavatkozást igényelnek a futtatás folytatásához. |
|  | Tájékoztató | Nem kritikus üzenet érhető el. |

Futtatási mérőszámok

A szoftver megjeleníti a futtatás során létrehozott mérőszámokat. Az RTA3 által készített és az InterOp-fájlokba írt adatok grafikonok és táblázatok formájában jelennek meg.

A klaszterezés körülbelül 2 órát vesz igénybe, majd a szekvenálás az 1. ciklussal kezdődik. A mérőszámok frissítésre kerülnek a szekvenálás előrehaladtával. A szűrőn, a hozamon és a minőségi pontszámokon átjutó klaszterek a 26. ciklus után állnak rendelkezésre. A 26. ciklus előtt egyetlen érték sem kerül kitöltésre és nem alkalmazhatóként van megjelölve.

Szekvenálás után

A következő szakaszok utasításokat adnak a szekvenálás befejezése után bekövetkező lépésekre vonatkozóan.

Automatikus futtatás utáni mosás

Amikor a szekvenálás befejeződött, a szoftver elindítja az automatikus, futtatás utáni mosást, amely körülbelül 80 percig tart. A rendszer 0,24%-os nátrium-hipokloritot (NaOCl) szivattyúz a 17. helyről, és 0,12%-ra hígítja. A rendszer a 0,12%-os NaOCl oldatot az ExAmp reagens és könyvtár pozíciókba szivattyúzza az áramlási cellán keresztül, majd a használtreagens-palackokba szivattyúzza. A mosófolyadék kiöblíti a sablont a rendszerből a keresztszennyeződés megelőzése érdekében.

Amikor a mosás befejeződött, a rendszer biztonságos állapotba kerül, és a Home (Kezdőlap) gomb aktívvá válik. Hagyja a fogyóeszközöket a helyükön a következő futtatásig. A mosás után a szívókák az SBS-ben és a klaszterkazettákban maradnak, hogy megakadályozzák a levegő rendszerbe jutását. A pufferkazettában lévő szívókák felemelkednek, hogy a használtreagens-palackokat ki lehessen üríteni. Ezután a mosópuffert átpumpálják az összes vezetéken, a NaOCl és a reagenseket eltávolításához a rendszerből.

MEGJEGYZÉS Ha hiba történik az automatikus futtatás utáni mosás során, és a futtatás utáni mosás hiányos, akkor karbantartási mosásra van szükség.

30. leválasztási pozíció

A klaszterkazetta 30. pozíciójában lévő tartály formamidot tartalmaz. Eltávolítják a használt klaszterkazettából, és külön ártalmatlanítják.



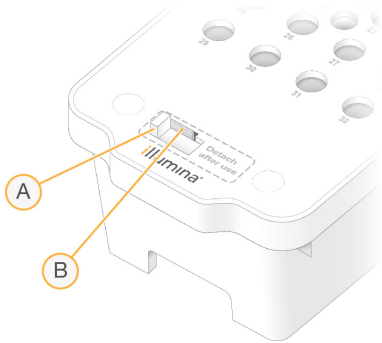
FIGYELEM!

Ezek a reagensek potenciálisan veszélyes vegyszereket tartalmaznak. Belégzésük, lenyelésük, bőrrel való érintkezésük és szembe kerülésük esetén személyi sérülést okozhatnak. Viseljen védőfelszerelést, így védőszemüveget, kesztyűt és laborköpenyt a kockázat mértékének megfelelően. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a regionális, országos és helyi törvényeknek és előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. További környezetvédelmi, egészségügyi és biztonsági információkért tekintse meg a következő címen elérhető SDS: support.illumina.com/sds.html.

1. Kesztyű viselése közben nyomja jobbra a **Detach after use** (Használat utáni leválasztás) feliratú fehér műanyag fület.
2. Helyezzen egy kezet vagy szilárd felületet a tartály alá, és nyomja az átlátszó műanyag fület az Illumina felirat felé, hogy a tartály kiszabaduljon a klaszterkazetta alól.

MEGJEGYZÉS A tárolás során kerülje a klaszterkazetták egymásra helyezését. Az egymásra helyezés a tartály véletlen leválását okozhatja.

11 ábra Eltávolítható 30-as pozíció



- A. Fehér műanyag fül a leválasztáshoz
- B. Távolítsa el a műanyag fület a kioldáshoz

3. Ártalmatlanítsa a tárolót a hatályos előírásoknak megfelelően.

Szekvenálási eredmények

Szekvenálás közben az adatok automatikusan továbbításra kerülnek a NovaSeq 6000Dx Instrument készülékről a Illumina DRAGEN Server készülékre. Amikor az elsődleges elemzés befejeződik, és az adatátvitel kész, a másodlagos elemzés automatikusan elkezdődhet a Illumina DRAGEN Server szerveren az Illumina Run Manager-ben kiválasztott alkalmazás által meghatározott elemzési opciók használatával. A létrejött eredmények a futtatás beállítása során kiválasztott opcióktól függenek. Egy futtatás eredményeinek megtekintéséhez válassza ki a kívánt futtatás nevét a Completed (Befejezett) lapon a Runs (Futtatások) képernyőn. A kimeneti fájlokat az Instrument Settings (Készülékbeállítások) képernyőn megadott helyen is megtalálhatja.

Real-Time Analysis

A NovaSeq 6000Dx Instrument RTA3-et futtat, ami a Real-Time Analysis szoftver alkalmazása a készülék Compute Engine (CE) rendszerén. A RTA3 kinyeri az intenzitásokat a kamerán kapott képekből, elvégzi az alapazonosításokat, minőségi pontszámot rendel a bázisazonosításokhoz, illeszkedik a PhiX-hez, és InterOp fájlokban jelenti az adatokat.

A feldolgozási idő optimalizálása érdekében az RTA3 az információkat a memóriában tárolja. Ha az RTA3 megszakad, a feldolgozás nem folytatódik, és a memóriában feldolgozott futtatási adatok elvesznek.

RTA3 bemenetek

Az RTA3-nek a feldolgozáshoz a helyi rendszermemóriában található mozaikképekre van szüksége. Az RTA3 futtatási információkat és parancsokat kap az NVOS szoftvertől.

RTA3 kimenetek

Az egyes színcsatornák képei a memóriában csempékként kerülnek továbbításra az RTA3-ba. Ezekből a képekből az RTA3 minőség szerint pontosított bázisazonosító fájlokat és szűrőfájlokat állít elő. Az összes többi kimenet a kimeneti fájlokat támogatja.

| Fájltípus | Leírás |
|-----------------------|--|
| Bázisazonosító-fájlok | Minden elemzett mozaik egy összefűzött bázisazonosító (*.cbcl) fájlban található. Az ugyanabból a sávból és felületből származó mozaikok egy CBCL fájlba kerülnek összevonásra minden sáv és felület esetén. |
| Szűrőfájlok | Minden mozaik egy szűrőfájlt (*.filter) hoz létre, amely meghatározza, hogy egy klaszter átjut-e a szűrőkön. |

Az RTA3 valós idejű mérőszámokat biztosít az InterOp fájllokként tárolt futtatási minőségről, amely mozaikot, ciklust és olvasási szintű mérőszámokat tartalmazó bináris kimenet.

Hibakezelés

Az RTA3 naplófájlokat hoz létre, amelyeket a Logs (Naplók) mappába ment. A hibákat egy *.log formátumú szöveges fájlba menti.

A feldolgozás végén az alábbi naplófájlokat másolja át a végső kimeneti mappába:

- Az `info_00000.log` összefoglalja a fontos futtatási eseményeket.
- Az `error_00000.log` a futtatás során jelentkező hibákat sorolja fel.
- Az `warning_00000.log` a futtatás során jelentkező figyelmeztetéseket sorolja fel.

Az áramlási cella mozaikjai

A mozaikok az áramlási cella kis képalkotó területei. A kamera egy képet készít minden rendről, amelyet a szoftver mozaikokra oszt fel RTA3 feldolgozás céljából. A mozaikok teljes száma attól függ, hogy hány sor, rend és felület van leképezve az áramlási cellán.

- Az S2 áramlási cellák összesen 1408 mozaikból állnak.
- Az S4 áramlási cellák összesen 3744 mozaikból állnak.

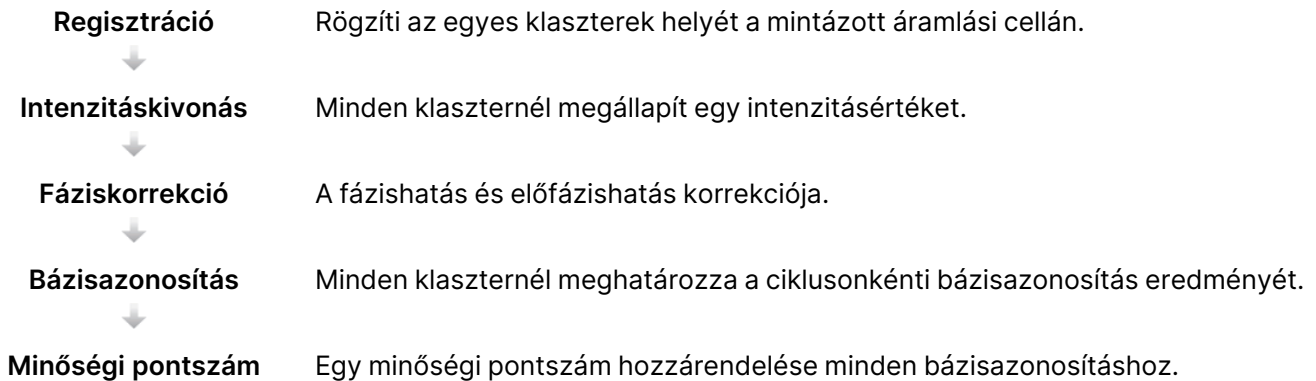
| Az áramlási cella összetevője | S2 | S4 | Leírás |
|-------------------------------|----|----|--|
| Sorok | 2 | 4 | A sor egy fizikai csatorna bemeneti és kimeneti nyílással. |

| Az áramlási cella összetevője | S2 | S4 | Leírás |
|-------------------------------|------|------|---|
| Felületek | 2 | 2 | Az S2 és S4 áramlási cella két felületén történik képképzés: a felső és az alsó felületen. Először a mozaik felső felületét kell leképezni. |
| Rendek száma soronként | 4 | 6 | A rend az áramlási cella sorjában lévő oszlop, amelyet a kamera egyetlen beolvasott képként rögzít. |
| Rendenkénti mozaikszám | 88 | 78 | A mozaik a rend egy része, és az áramlási cella leképezett területét ábrázolja. |
| Összes létrehozott mozaik | 1408 | 3744 | A sorok száma × felületek száma × rendek száma × mozaikok száma rendenként egyenlő a csempék teljes számával. |

A mozaik neve egy ötjegyű szám, amely az áramlási cellán lévő mozaik pozícióját képviseli. Például az 1_1205 mozaiknév az 1. sorban a felső felületet, a 2. rendet, az 5. mozaikot jelöli.

- Az első számjegy a sáv száma:
 - 1 vagy 2 S2 áramlási cellánál.
 - 1, 2, 3 vagy 4 S4 áramlási cellánál.
- A második számjegy a felületet jelöli: 1 a felső vagy 2 az alsó.
- A harmadik számjegy a rendszámot jelöli:
 - 1, 2, 3 vagy 4 S2 áramlási cellánál.
 - 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6 S4 áramlási cellánál.
- Az utolsó két számjegy a mozaik számát jelöli. A számozás az áramlási cella kimeneti végénél 01-gyel kezdődik, a bemeneti végénél pedig 88-cal vagy 78-cal.
 - 01 és 88 között van egy S2 áramlási cellánál.
 - 01 és 78 között van egy S4 áramlási cellánál.

Real-Time Analysis munkafolyamata



Regisztráció

A regisztráció egy képet igazít a nanoüregek elforgatott négyzetsorához a mintázott áramlási cellán. A nanoüregek rendezett elrendezése miatt a csempében lévő egyes klaszterek X és Y koordinátái előre meg vannak határozva. A klaszterpozíciók minden futtatásnál klaszterhely (s.locs) fájlba vannak írva.

Ha egy ciklusban valamelyik kép esetén sikertelen a regisztráció, abban a ciklusban ahhoz csempéhez nem történik bázisazonosítás.

Intenzitáskivonás

A regisztrálás után az intenzitáskivonás során a rendszer egy adott kép minden nanoüregénél kiszámítja az intenzitás értékét. Ha a regisztráció sikertelen, az adott csempe intenzitása nem nyerhető ki.

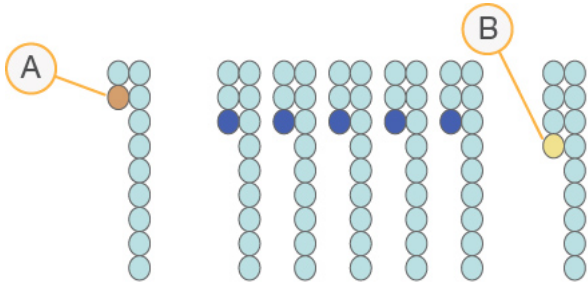
Fáziskorrekció

A szekvenálási reakció közben az egyes klaszterek DNS-szála ciklusonként eggyel bővülnek. Fázishatás és előfázishatás akkor következik be, amikor egy szál kiesik a fázisból az aktuális beépítési ciklusban.

Fázishatás akkor következik be, amikor egy bázisbeépülés lemarad.

Előfázishatás akkor következik be, amikor egy bázisbeépülés előre ugrik.

12 ábra Fázishatás és előfázishatás



- A. Fázishatás alatt lévő bázis beolvasása
- B. Előfázishatás alatt lévő bázis leolvasása.

Az RTA3 korigálja a fázishatást és előfázishatást, ezzel maximalizálva az adatok minőségét minden ciklusban a futtatás teljes ideje alatt.

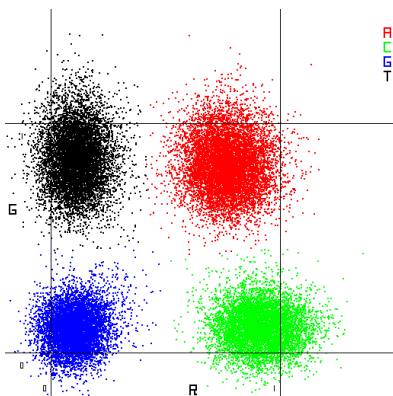
Bázisazonosítás

A bázisazonosítás során egy meghatározott ciklus adott cempéje minden klaszteréhez meghatározásra kerül egy bázis (A, C, G vagy T). A NovaSeq 6000Dx Instrument kétcsatornás szekvenálást alkalmaz, így mindössze két képre van szükség ahhoz, hogy megkülönböztesse a négyféle DNS-bázist: egy képre a zöld csatornáról, egy képre pedig a piros csatornáról.

A rendszer a nem azonosítható elemet N-ként jelöli. Nem történik azonosítás, amikor a klaszter nem jut át a szűrőn, a regisztráció sikertelen, vagy ha a klaszter eltolódik a képről.

Az egyes klaszterek intenzitását a piros és zöld képekből nyerik ki, és összehasonlítják egymással hasonlítják, ami négy különböző populációt eredményez. Mindegyik populáció egy bázisnak felel meg. A bázisazonosítási folyamat határozza meg, hogy az egyes klaszterek mely populációba tartoznak.

13 ábra A klaszterintenzitások vizuális megjelenítése



8 táblázat Bázisazonosítások 2 csatornás szekvenálás esetén

| Bázis | Piros csatorna | Zöld csatorna | Eredmény |
|-------|----------------|---------------|---|
| A | 1 (be) | 1 (be) | A piros és a zöld csatornában is intenzitást mutató klaszterek. |
| C | 1 (be) | 0 (ki) | Csak a piros csatornában intenzitást mutató klaszterek. |
| G | 0 (ki) | 0 (ki) | A klaszter ismert helyén intenzitást nem mutató klaszterek. |
| T | 0 (ki) | 1 (be) | Csak a zöld csatornában intenzitást mutató klaszterek. |

A szűrőn átmenő klaszterek

Futtatás közben az RTA3 kiszűri a nyersadatokból azokat a beolvasásokat, amelyek nem felelnek meg a szükséges minőségi küszöbértékeknek. Eltávolítja az egymást átfedő és az alacsony minőségű klasztereket.

A kétcsatornás elemzéshez az RTA3 populációalapú rendszert használ a bázisazonosítások tisztaságának (intenzitástisztaság) meghatározására. A klaszterek akkor mennek át a szűrőn (PF), amikor az első 25 ciklusban legfeljebb egy bázisazonosítás van a fix tisztasági küszöbérték alatt. Ha szerepel benne, a 26. ciklusban a rendszer PhiX-egyeztetést hajt végre azoknak a klasztereknek egy csempecsoportján, amelyek átmentek a szűrőn. Azon klaszterek esetében, amelyek nem mentek át a szűrőn, a rendszer nem végzi el a bázisazonosítást és az egyeztetést.

Minőségi pontszámok

A minőségi pontszám (Q-pontszám) annak előrejelzése, hogy mekkora a valószínűsége egy hibás bázisazonosításnak. Minél magasabb a Q-pontszám, annál jobb minőségű a bázisazonosítás, és annál valószínűbb, hogy a bázisazonosítás helyes. A Q-pontszám megállapítása után a rendszer a CBCL-fájlokban rögzíti az eredményeket.

A Q-pontszám tömören kommunikálja a kis hibalehetőségeket. A minőségi pontszámot a Q(X) formában jelenik meg, ahol X maga a pontszám. Az alábbi táblázatban egy minőségi pontszám és a hiba előfordulási valószínűségének kapcsolata látható.

| Q-pontszám Q(X) | Hiba előfordulásának valószínűsége |
|-----------------|------------------------------------|
| Q40 | 0,0001 (10 000-ből 1) |
| Q30 | 0,001 (1000-ből 1) |
| Q20 | 0,01 (100-ből 1) |
| Q10 | 0,1 (10-ből 1) |

Minőségi pontszám és jelentés

A minőség osztályozása során a rendszer minden bázisazonosításnál kiszámít néhány prediktort, majd az előre jelzett értékek alapján kikeresi a Q-pontszámot egy minőségi táblázatból. A minőségi táblázatok arra szolgálnak, hogy optimális pontosságú előrejelzéseket adjanak a meghatározott beállítású szekvenálási platformon és kémiai verzió mellett létrehozott futtatásokhoz.

A minőség osztályozása a Phred-algoritmus egy módosított változatán alapul.

A Q-táblázat létrehozásához a NovaSeq 6000Dx Instrument esetén, három bázisazonosítási csoportot határoztak meg ezen specifikus prediktív funkciók csoportosítása alapján. A bázisazonosítások csoportosítását követően az átlagos hibaarányt empirikusan számították ki mindhárom csoportra, és az ezeknek megfelelő Q-pontszámokat rögzítették a Q-táblázatban az adott csoporthoz tartozó prediktív jellemzőkkel együtt. Így az RTA3-mal csak három Q-pontszám lehetséges, és ezek a Q-pontszámok képviselik a csoport átlagos hibaarányát. Összességében ez egyszerűsített, mégis rendkívül pontos minőségi pontozást eredményez. A minőségi táblázatban szereplő három csoport megfelel a marginális (< Q15), közepes (~Q20) és kiváló (> Q30) bázisazonosításoknak, és a 12-es, 26-os, illetve 34-es specifikus pontszámokat jelölik ki. Ezenkívül a 2-es zéró pontszámot hozzárendelik bármely nem azonosításhoz. Ez a Q-pontszám jelentési modell a pontosság és a teljesítmény befolyásolása nélkül csökkenti a tárhelyre és a sávszélességre vonatkozó előírásokat.

14 ábra Egyszerűsített Q-pontozás RTA3-mal



Szekvenálási kimeneti fájlok


| Fájltípus | A fájl leírása, helye és neve |
|----------------------------|--|
| Bázisazonosító-fájlok | Minden, elemzésen átesett klaszter bekerül egy bázisazonosító fájlba. Ciklusonként, soronként és felületenként egy ilyen összesítő fájl jön létre. Az összesített fájl tartalmazza minden klaszter bázisazonosítását és a kódolt minőségi pontszámot. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, például L001_1.cbcl |
| Klaszterhelyfájlok | Minden áramlási cellánál egy bináris klaszterhelyfájl tartalmazza a klaszterek XY koordinátáit az adott mozaikban. A koordinátákat az áramlási cella nanoüreges elrendezéséhez illeszkedő hatszögletű elrendezés határozza meg. Data\Intensities s_[lane].locs |
| Szűrőfájlok | A szűrőfájl határozza meg, hogy egy klaszter átment-e a szűrőkön. A rendszer a 26. ciklusnál hozza létre a szűrőfájlokat, a 25. ciklus adatai alapján. A rendszer minden mozaikhoz létrehoz egy szűrőfájlt. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter |
| Futtatási információs fájl | Tartalmazza a futtatás nevét, a kiolvasásonkénti ciklusok számát, hogy a kiolvasás indexelt kiolvasás-e, valamint az áramlási cellában lévő rendek és mozaikok számát. A futtatási információs fájl a futtatás elején jön létre. [Root folder], RunInfo.xml |
| Miniatűr-fájlok | Miniatűrképek minden egyes szekvenálási leolvasás első ciklusánál. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]—A fájlok minden ciklusnál egy almappában tárolódnak. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg—A miniatűrkép tartalmazza a csempe számát. |

A szekvenálási kimeneti mappa szerkezete

A NVOS automatikusan létrehozza a kimeneti mappa nevét.

 **Config**—A futtatás konfigurációs beállításai.


 **Logs**—A működési lépéseket, a műszer analitikáját, és az RTA3 eseményeket leíró naplófájlok.

 SampleSheet.csv—Mintalap vagy más csatolt fájl, ha van ilyen.


 **Data**


 **Intensities**


 **BaseCalls**


 **L00[X]**—Bázisazonosító fájlok (*.cbcl), soronként, felületenként és ciklusonként egy fájlba összesítve.

 s.locs—A futtatás klaszterhelyeinek fájlja.

 **InterOp**—Bináris fájlok.

 **Recipe**—Futtatás-specifikus előírásfájl.

 **Thumbnail Images**—Minitúrképek minden 10. mozaikhoz.

 **LIMS**—A futtatás-beállítási fájl (*.json), ha alkalmazható.

 **Audit**

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SequenceComplete.txt

 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

 Manifest.tsv

Figyelmeztetések és óvintézkedések



FIGYELEM!

Az USA szövetségi törvényei szerint e készülék csak orvos vagy az illető államban jóváhagyott szakember által vagy rendelvényére árusítható.

- **Az Illumina által a NovaSeq 6000Dx Instrument készülékkel való használatra biztosított reagensek egyes összetevői potenciálisan veszélyes vegyi anyagokat tartalmaznak. Belélegzésük, lenyelésük, bőrrel való érintkezésük és szembe kerülésük esetén személyi sérülést okozhatnak. Viseljen védőfelszerelést, így védőszemüveget, kesztyűt és laborköpenyt a kockázat mértékének megfelelően. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a regionális, országos és helyi törvényeknek és előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa.** A további környezetvédelmi és munkavédelmi információkért tekintse meg a biztonsági adatlapot (SDS) a support.illumina.com/sds.html weboldalon.
- Az eljárások leírtaktól eltérő módon történő végrehajtása hibás eredményeket eredményezhet, vagy jelentősen csökkentheti a minta minőségét.
- Használja a rutinszerű laboratóriumi óvintézkedéseket. Ne pipettázzon szájjal. Ne étkezzon, igyon vagy dohányozzon a munkaterületként megjelölt területeken. A minták és a készlet reagensei kezelésekor viseljen eldobható gumikesztyűt és laboratóriumi köpenyt. A minták és a készletreagensek kezelése után alaposan mosson kezet.

- Megfelelő laboratóriumi gyakorlat és jó laboratóriumi higiénia szükséges annak megelőzéséhez, hogy a PCR-termékek szennyezzék a reagenseket, az eszközöket és a genomikus DNS-mintákat. A PCR-termékekkel való szennyeződés pontatlan és megbízhatatlan eredményeket okozhat.
- A szennyeződés elkerülése érdekében ügyeljen arra, hogy az amplifikáció előtti és az az utáni területeken külön berendezések és fogyóeszközök legyenek (például pipetták, pipettahegyek, fűtőblokkok, vortexelő és centrifugák).
- Az index–minta párosításnak pontosan meg kell felelnie az index lemezelrendezésnek. A DNA Prep with Enrichment alkalmazás automatikusan kitölti a mintanevekhez társított indexprimereket, amikor a futtatás beállítása során megadja őket. Javasoljuk a felhasználónak, hogy ellenőrizze a mintákkal társított indexprimereket a szekvenálási futtatás indítása előtt. A mintalap és a lemezelrendezés közötti eltérések esetén a pozitív minták azonosításának elmaradása és helytelen eredmények jelentése történik.
- A számítógép vírusok elleni védelme érdekében határozottan ajánlott a felhasználó által biztosított vírusirtó szoftver telepítése.
- A NovaSeq 6000Dx készüléket csak a panelek megbontása nélkül szabad működtetni. A készülék eltávolított panelek melletti működtetése hálózati feszültségnek és egyenfeszültségnek való potenciális kitétséget jelent.
- Ne érintse meg az áramlási cella rekeszében található áramlási cella emelvényt. Az itt található fűtő hőmérséklete 22 °C és 95 °C között változik, és égési sérülést okozhat.
- A készülék tömege körülbelül 480 kg (1059 font), és leejtés vagy nem rendeltetésszerű kezelés esetén súlyos sérülést okozhat.

Teljesítményjellemzők

A NovaSeq 6000Dx műszer teljesítményjellemzőit a könyvtár-előkészítéshez az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx segítségével, a szekvenáláshoz a NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) segítségével határozták meg, valamint másodlagos elemzéshez a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás segítségével, beleértve a csírvonal és a szomatikus variánsok kimutatását. Az elvégzett vizsgálatok többek között: mintaindexelés, mintaátvitel, bemeneti DNS mennyisége, analitikai szenzitivitás (vak-határérték és kimutatási határérték), pontosság, precizitás, módszerek összehasonlítása és reprodukálhatóság. A preanalitikai tényezőkkel, például az extrakciós módszerekkel vagy a zavaró anyagokkal kapcsolatos teljesítményjellemzőket lásd: *Illumina DNA Prep with Enrichment Dx csomag melléklettel*.

A teljesítményjellemzők számításaiban használt definíciók

1. A pozitív százalékos egyezés (PPA) a referencia-módszerrel variánsként azonosított lókuszek közül a vizsgálat által helyesen azonosítottak aránya.
 - $(\text{a vizsgálat által helyesen azonosított variáns lókuszek száma}) / (\text{variáns lókuszek száma})$

- A vizsgálattal és a referencia-módszerrel is helyesen azonosított variáns lókuszok a valódi pozitívak (TP). A referenciaként vagy másféle variánsként azonosított, valójában variáns lókuszok az álnegatívak (FN).
- A negatív százalékos egyezés (NPA) a referencia-módszerrel vad típusúként azonosított lókuszok közül a vizsgálat által helyesen azonosítottak aránya.
 - $(\text{a vizsgálat által helyesen azonosított vad típusú lókuszok száma}) / (\text{vad típusú lókuszok teljes száma})$A vizsgálattal és a referencia-módszerrel is helyesen azonosított vad típusú lókuszok a valódi negatívak (TN). A vizsgálat által variánsként azonosított, valójában vad típusú lókuszok az álpozitívak (FP).
 - A teljes százalékos egyezés (OPA) a vizsgálat által a referencia-módszernek megfelelően azonosított lókuszok aránya.
 - $((\text{a vizsgálat által helyesen variánsként azonosított lókuszok száma}) + (\text{a vizsgálat által helyesen vad típusúként azonosított lókuszok száma})) / ((\text{variáns lókuszok teljes száma}) + (\text{vad típusú lókuszok teljes száma}))$
 - A PPA, NPA és OPA számításában nem szerepelnek a nem azonosított lókuszok (a bármelyik minőségi szűrőnek meg nem felelő variáns vagy referencialókuszok).
 - A százalékos pozitív azonosítások (PPC) a kimutatott variánssal rendelkező megfigyelések száma osztva a tesztelt megfigyelések teljes számával, kivéve az érvénytelen megfigyeléseket vagy az alacsony mélységűként szűrteket.
 - A százalékos negatív azonosítások (PNC) kiszámítása: egy pozíció eredményeként sikeres referenciával rendelkező megfigyelések száma osztva a tesztelt megfigyelések teljes számával, kivéve az érvénytelen megfigyeléseket vagy az alacsony mélységűként szűrteket.
 - A Százalékos Autoszomális Azonosíthatóság kiszámítása: a nem-N referenciapozíciók százalékos aránya a cél régiókban sikeres genotípus-azonosítással rendelkező autoszomális kromoszómákban.

Mintaindexelés

A könyvtárkészítés során hozzáadott mintaindexprimerek egy egyedi szekvenciát rendelnek minden egyes minta DNS-éhez. Ezek az egyedi szekvenciák teszik lehetővé több minta összevonását egyetlen szekvenálási futtatásban. A mintaindexelés a csírvonalbeli és a szomatikus munkafolyamatban is használatos. E vizsgálat célja az volt, hogy megállapítsa a NovaSeq 6000Dx Instrument használatával egyetlen szekvenálási futtatás során feldolgozható minták minimális (12) és maximális (192) számát. Tizenkettő egyedi Platinum Genome DNS-mintát (NA12877–NA12888) vizsgáltak, mintánként legalább 12 különböző indexprimer-kombinációval. Mintakönyvtárakat készítettek reprezentatív vizsgálattal mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző gének leolvasásával. A DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csírvonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatát használó négy szekvenálási futtatásból származó mintaeredményeket összehasonlították a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával.

Az első futtatási sorozatban 192 egyedi indexszel ellátott mintakönyvtárat szekvenáltak két szekvenálási futtatásban, egy-egy S2 és S4 reagenssel, hogy ellenőrizzék mind a támogatott indexek maximális számát, mind pedig azt, hogy a vizsgálat következetesen képes-e genotipizálási azonosítást végezni egy adott mintára

különböző indexelő primer kombinációkon át. A második futtatási sorozatban 12 egyedi indexszel ellátott mintakönyvtárat szekvenáltak két szekvenálási futtatásban, egy-egy S2 és S4 reagenssel, hogy ellenőrizzék a támogatott indexek minimális számát.

A 192-indexes futtatások esetében a PPA az SNV-k esetében 99,7–100%, a PPA az inzerciók esetében 100%, a PPA a deléciók esetében 96,7–100%, az NPA pedig 100% volt. A 12-indexes futtatások esetében a PPA az SNV-k esetében 99,7–100%, a PPA az inzerciók esetében 89,6–100%, a PPA a deléciók esetében 94,6–100%, az NPA pedig 100% volt.

Mintaátvitel

A NovaSeq 6000Dx Instrument készülékkel több minta és kontroll szekvenálható egy szekvenálási futtatás során. Vizsgálatot végeztek a szekvenálási futtatáson belüli és a szekvenálási futtatások közötti mintaátvitel mértékének értékelésére. Tizenkettő Platinum Genome DNS-mintán, hat férfi és hat női mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző gének leolvasásával. A könyvtárat a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csírvonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatának használatával a NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken szekvenálták. A férfi minták átvitelét a női mintákba az alapján mutatták ki, hogy az Y-kromoszóma célgénjei jelen voltak a női mintákban.

Futtatáson belüli átvitel történhet a klasztergenerálás, az indexciklusban történő bázisazonosítás és a minta demultiplikálása során. A mintaátvitel teszteléséhez egy szekvenálási futtatáson belül egy könyvtárcsoportot szekvenáltak, amely minden egyedi férfi és női minta legalább tizenkét replikátumából, plusz két templát nélküli kontrollból állt, így összesen 192 egyedi indexelt könyvtárat szekvenáltak a NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken két szekvenálási futtatásban, egy-egy S2 és S4 reagenssel. A futtatáson belüli mintaátvitel értékeléséhez összehasonlították az Y-kromoszóma célgénjeinek előfordulását a női minták egyes ismétléseiben és az Y-kromoszóma célgénjeinek átlagos előfordulását a férfi minták összes ismétlődésében. A megfigyelt futtatáson belüli átvitel 95. percentilise 0,0090%, illetve 0,041% volt az S2 és S4 reagenssek esetében.

A futtatások közötti mintaátvitel teszteléséhez két könyvtárcsoportot készítettek elő és egymás után szekvenáltak egy NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken az A oldalon S4 reagenssekkel, a B oldalon pedig S2 reagenssekkel. Az első csoport hat egyedi női minta legalább tizenkét replikátumát tartalmazta, valamint két templát nélküli kontrollt, így összesen 96 egyedi indexelt könyvtárat tartalmazott. A második csoport hat egyedi férfi minta legalább tizenkét replikátumát tartalmazta, valamint két templát nélküli kontrollt, így összesen 96 egyedi indexelt könyvtárat tartalmazott. Mindkét keverékben ugyanazokat az indexadaptereket használták. Először a női mintákból álló keveréket szekvenálták, majd a férfi mintákból álló keveréket, majd ismét a női mintákból álló keveréket. A futtatások közötti mintaátvitel S2 és S4 reagenstípusok szerinti értékeléséhez összehasonlították az Y-kromoszóma célgénjeinek előfordulását a női mintakeverék második futtatása során mért ismétlésekben, és a férfi mintakeverék ezeknek megfelelő ismétléseiben. A megfigyelt futtatások közötti átvitel 95. percentilise 0,0089%, illetve 0,012% volt az S2 és S4 reagenssek esetében.

DNS-bemenet

Vér (csírvonal)

A vérben lévő DNS bemeneti tartománya a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx készlethez a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazást használva meghatározásra került a NovaSeq 6000Dx esetén. Ezt egy sorozatos hígításos vizsgálatban értékelték, amelyben nyolc Platinum Genome DNS-mintán (NA12877 – NA12884) reprezentatív vizsgálatot végeztek mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző gén leolvasásával. A könyvtárak egy NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken lettek szekvenálva, a NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) tételből egyet-egyet használva.

Hét minta esetén hatféle bemeneti DNS-mennyiséget vizsgáltak két méréssel 1000 ng és 10 ng között (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng és 10 ng). Egy nyolcadik mintát (NA12884) teszteltek egyetlen méréssel 10 ng bemenetnél, és két méréssel minden más bemeneti mennyiségnél. A pontosság meghatározásához a minták genotípusát a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával hasonlították össze. Az eredményeket meghatározták mindegyik bemeneti mennyiség esetében. Az egyes variánstípusok (SNV-k, inzerciók és deléciók) PPA-értékei az [Mindegyik bemeneti vérben lévő DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok szerint a\(z\) 34. oldalon](#). Az NPA [NPA az egyes bemeneti vérben lévő DNS-mennyiségek esetén a\(z\) 35. oldalon](#). Mindegyik bemeneti szint hasonló pontosságot mutatott. A Illumina DNA Prep with Enrichment Dx esetén a vérben lévő DNS ajánlott bemeneti mennyisége 50–1000 ng, a teljesítményjellemzőknek való megfeleléshez a felső és az alsó határérték 1000 ng és 10 ng a NovaSeq 6000Dx készüléken történő szekvenáláskor.

9 táblázat Mindegyik bemeneti vérben lévő DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok szerint

| Bemeneti DNS mennyisége (ng) | Variáns típusa | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | PPA (%) |
|------------------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|---------|
| 10 | SNV | 69612 | 69538 | 68 | 6 | 99,9 |
| 25 | | 74192 | 74105 | 75 | 12 | 99,9 |
| 50 | | 74105 | 74 | 13 | 99,9 | |
| 100 | | 74116 | 72 | 4 | 99,9 | |
| 250 | | 74113 | 72 | 7 | 99,9 | |
| 1000 | | 74112 | 73 | 7 | 99,9 | |

| Bemeneti DNS mennyisége (ng) | Variáns típusa | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | PPA (%) |
|------------------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|---------|
| 10 | Inzerció | 2732 | 2732 | 0 | 0 | 100 |
| 25 | | 2928 | 2916 | 6 | 6 | 99,8 |
| 50 | | 2914 | 8 | 6 | 99,7 | |
| 100 | | 2917 | 6 | 5 | 99,8 | |
| 250 | | 2928 | 0 | 0 | 100 | |
| 1000 | | 2921 | 5 | 2 | 99,8 | |
| 10 | Deléció | 2084 | 2049 | 4 | 31 | 99,8 |
| 25 | | 2240 | 2200 | 9 | 31 | 99,6 |
| 50 | | 2207 | 3 | 30 | 99,9 | |
| 100 | | 2199 | 1 | 40 | > 99,9 | |
| 250 | | 2201 | 0 | 39 | 100 | |
| 1000 | | 2195 | 2 | 43 | 99,9 | |

10 táblázat NPA az egyes bemeneti vérben lévő DNS-mennyiségek esetén

| Bemeneti DNS mennyisége (ng) | Valódi negatív | Álpozitív | Referencia, sikertelen azonosítások | NPA (%) |
|------------------------------|----------------|-----------|-------------------------------------|---------|
| 10 | 115449045 | 384 | 285751 | > 99,9 |
| 25 | 123012157 | 415 | 438153 | > 99,9 |
| 50 | 122985299 | 369 | 465043 | > 99,9 |
| 100 | 122976660 | 321 | 473730 | > 99,9 |
| 250 | 122971099 | 331 | 479289 | > 99,9 |
| 1000 | 122978527 | 324 | 471882 | > 99,9 |

FFPE (Szomatikus)

A Illumina DNA Prep with Enrichment Dx készlet formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) DNS bemeneti tartományát a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás segítségével hozták létre a NovaSeq 6000Dx készülék számára. Ezt egy sorozatos hígítási vizsgálatban értékelték, amelyben két Platinum Genome mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző gén leolvasásával. A könyvtárak egy NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken lettek szekvenálva, a NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) tételből egyet-egyet használva.

A GM12877 minta DNS-ét a GM12878 minta DNS-ével hígították, létrehozva a GM12877-13 mintát, amelyek közel 6,5%-os, illetve 13%-os gyakorisággal tartalmaztak egyedi GM12877 heterozigóta és homozigóta variánsokat. Hígítatlan GM12877 készítményt is teszteltek. A GM12877-13-at négyféle bemeneti DNS-mennyiséget vizsgálták két méréssel, 1000 ng és 25 ng között (1000 ng, 250 ng, 50 ng és 25 ng). A GM12877-et egyetlen méréssel vizsgálták 250 ng-nál, és két méréssel minden más bemeneti mennyiségnél. A pontosság meghatározásához a minták variánsazonosításait a Platinum Genomes 2016-1.0 verziójával hasonlították össze. Az eredményeket meghatározták mindegyik bemeneti mennyiség esetében. Az egyes variánstípusok (SNV-k, inzerciók és deléciók) PPA-értékei az [Mindegyik FFPE bemeneti DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok és VAF célértékek szerint a\(z\) 36. oldalon](#). Az NPA [NPA az egyes FFPE bemeneti DNS-mennyiségek esetén a\(z\) 36. oldalon](#). Mindegyik bemeneti szint hasonló pontosságot mutatott. A $\leq 5 \Delta Cq$ -értékű FFPE minták esetén a DNS ajánlott bemeneti mennyisége 50–1000 ng a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx készletnél, a teljesítményjellemzőknek való megfeleléshez a felső és az alsó határérték 1000 ng és 25 ng a NovaSeq 6000Dx készüléken történő szekvenálásakor.

11 táblázat Mindegyik FFPE bemeneti DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok és VAF célértékek szerint

| Hígítás VAF-célértéke | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|---------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|---------|
| 0,065 | | | | | | 0,13 | | | | | |
| Bemeneti DNS mennyisége (ng) | Variáns típusa | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | PPA (%) | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | PPA (%) |
| 25 | SNV | 3000 | 2931 | 8 | 61 | 99,7 | 624 | 624 | 0 | 0 | 100 |
| 50 | | 3000 | 2930 | 8 | 62 | 99,7 | 624 | 622 | 0 | 2 | 100 |
| 250 | | 3000 | 2927 | 8 | 65 | 99,7 | 624 | 624 | 0 | 0 | 100 |
| 1000 | | 3000 | 2921 | 8 | 71 | 99,7 | 624 | 624 | 0 | 0 | 100 |
| 25 | Inzerció | 96 | 96 | 0 | 0 | 100 | 48 | 48 | 0 | 0 | 100 |
| 50 | | 96 | 96 | 0 | 0 | 100 | 48 | 48 | 0 | 0 | 100 |
| 250 | | 96 | 96 | 0 | 0 | 100 | 48 | 48 | 0 | 0 | 100 |
| 1000 | | 96 | 96 | 0 | 0 | 100 | 48 | 48 | 0 | 0 | 100 |
| 25 | Deléció | 88 | 88 | 0 | 0 | 100 | 32 | 32 | 0 | 0 | 100 |
| 50 | | 88 | 88 | 0 | 0 | 100 | 32 | 31 | 0 | 1 | 100 |
| 250 | | 88 | 88 | 0 | 0 | 100 | 32 | 32 | 0 | 0 | 100 |
| 1000 | | 88 | 88 | 0 | 0 | 100 | 32 | 32 | 0 | 0 | 100 |

12 táblázat NPA az egyes FFPE bemeneti DNS-mennyiségek esetén

| Bemeneti DNS mennyisége (ng) | Várt vad típus | Valódi negatív | Álpozitív | Referencia, sikertelen azonosítások | NPA (%) |
|------------------------------|----------------|----------------|-----------|-------------------------------------|---------|
| 25 | 25354119 | 25353706 | 413 | 5499498 | > 99,9 |
| 50 | 27538269 | 27538013 | 256 | 3315421 | > 99,9 |
| 250 | 21562303 | 21561983 | 320 | 1577958 | > 99,9 |
| 1000 | 29030903 | 29030596 | 307 | 1822781 | > 99,9 |

Analitikai szenzitivitás (vak-határérték [LoB] és kimutatási határérték [LoD])

Ezt a vizsgálatot a NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken lévő DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Alkalmazás Szomatikus FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatára vonatkozó vak-határérték (LoB) és kimutatási határérték (LoD) értékelésére végezték el. A vizsgálatot reprezentatív vizsgálattal végezték mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző gének leolvasásával. A GM12878 és GM12877 Platinum Genome sejtvonalat formalinnal fixálták és paraffinba ágyzták, majd DNS-extrakciót végeztek. A GM12877 GM12878-ba történő hígítását úgy készítették elő, hogy a minták mennyiségileg 0%, 4%, 6,5% és 13% GM12877-ből álljanak, így a 489 egyedi GM12877 variáns (454 SNV, 17 inzerció és 18 delécio) variánsfrekvenciái 0 és 0,13 között voltak. A mintakönyvtárakat két Illumina DNA Prep with Enrichment Dx készlet reagenstétel felhasználásával készítették elő, és hat egymást követő indítási napon szekvenálták őket, két NovaSeq 6000Dx Instrument készülékkel és két-két NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) reagenstétellel, összesen tizenkét szekvenálási futtatáshoz. Ez 288 megfigyelést eredményezett minden egyes variáns esetében az egyes mintahígításokban. A LoB és LoD kiszámítása a CLSI EP17-A2-ben leírt klasszikus megközelítéssel történt. Az LoB és LoD értékeket az S2 és S4 reagensekre külön-külön számították ki, az egyes reagenstípusok szekvenálási futtatásában lévő összes variáns variánsgyakoriságának összevonásával. Az I. típusú hibát 0,01-es gyakorisággként, a II. típusú hibát pedig 0,05-ös gyakorisággként határozták meg.

A LoB-ot 489 lókuszra értékelték függetlenül, két szekvenálási tételen át minden reagenstípusra (S2 vagy S4) és könyvtár-előkészítésre. Az S2 reagensek esetében a 95. percentilis LoB értéke 2,9% volt. Az S4 reagensek esetében a 95. percentilis LoB értéke 2,2% volt.

Az LoD-értéket sikeresen kiszámították a 489 variánsból 478-ra az S2 esetében, és a 489 variánsból 485-re az S4 esetében. Azokat a variánsokat, amelyeknél nem határoztak meg LoD-t egyik vagy mindkét könyvtár-előkészítésnél, kizárták a NovaSeq 6000Dx rendszerre vonatkozó LoD végleges hozzárendeléséből. Az S2 és S4 reagensekkel rendelkező NovaSeq 6000Dx rendszer LoD értékét az egyes variáns LoD-k 95. percentilisének mérésével határozták meg. Az S2 reagensek esetében a 478 variáns LoD értékének 95. percentilise 4,8% volt. Az S4 reagensek esetében a 485 variáns LoD értékének 95. percentilise 3,9% volt.

Pontosság

Csírvonal

A következő vizsgálatot végezték el a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csírvonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatának variánsazonosító pontosságának értékelésére a NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken a NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) segítségével. Négy egyedi Platinum Genome DNS-mintát teszteltek reprezentatív vizsgálatban, melynek célja mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző gének (9232 célgén) leolvasása. Mindegyik mintát 12 ismétléssel tesztelték, kivéve az NA12880-at, amelyet 11 ismétléssel teszteltek. Összesen 18 futtatást végeztek három szekvenálókészülékkel, három S2 reagenstétellel, két kezelővel és hat különböző indítási napon történő kezdéssel. Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával.

13 táblázat A csírvonalbeli eredmények egyezésének összefoglalása

| Kritérium | Összes megfigyelés ¹ | Megfigyelés eredménye ² | Eredmény futtatás szerint ³ |
|-------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--|
| Az SNV-k PPA-értéke | 846 | 99,8 | 99,9 |
| Az inzerciók PPA-értéke | 846 | 97,9 | > 99,9 |
| A deléciók PPA-értéke | 846 | 96,9 | 99,9 |
| NPA | 846 | > 99,9 | > 99,9 |
| OPA | 846 | > 99,9 | > 99,9 |

¹Számítás: futtatásonkénti minták száma (47) x futtatások száma (18) = 846.

²A legalacsonyabb megfigyelt érték az egyes mintaismétlések mind a 18 futtatásból kapott adatai alapján.

³A legalacsonyabb érték az egyes futtatások adatainak összesített elemzésével.

A [Csírvonalbeli eredmények egyezése minták szerint a\(z\) 39. oldalon](#) tartalmazza a vizsgálat adatait a pozitív és a negatív százalékos egyezéssel együtt, mintánként; a PPA számításához a variáns eredmények a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával összehasonlítva szerepelnek. A három variánstípus (SNV-k, inzerciók és deléciók) eredményeit összevonva mutatjuk be. Mivel a referencia-módszer csak az egynukleotid-variánsokra és az inzerciókra/deléciókra ad eredményt, az NPA-számításhoz a nem variáns bázisszekvenciák a humán genom hg19 referenciaszekvenciájával vannak összehasonlítva.

14 táblázat Csírvonalbeli eredmények egyezése minták szerint

| Minta | Autoszomás azonosítási lehetőség | Várt variánsok ¹ | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | Valódi negatív | Álpozitív | PPA | NPA | OPA |
|---------|----------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------|-------------------------------|----------------|-----------|------|--------|--------|
| NA12877 | 99,4 | 273672 | 273452 | 220 | 0 | 414765131 | 931 | 99,9 | > 99,9 | > 99,9 |
| NA12878 | 99,4 | 265680 | 265208 | 234 | 238 | 414803691 | 1193 | 99,9 | > 99,9 | > 99,9 |
| NA12879 | 99,4 | 261792 | 261792 | 0 | 0 | 414746986 | 1429 | 100 | > 99,9 | > 99,9 |
| NA12880 | 99,4 | 246114 | 245551 | 399 | 164 | 380157538 | 1458 | 99,8 | > 99,9 | > 99,9 |

¹ A variánsok teljes száma az összes mintaismérlésben a 18 futtatás során.

A [Csírvonalbeli eredmények egyezése minták szerint, variánstípusok szerint a\(z\) 39. oldal](#) tartalmazza a vizsgálat adatait mintánként; a variáns eredmények a pontosan jellemzett, kombinált referencia-módszerrel összehasonlítva szerepelnek. A kimutatást külön értékelték az egyes variánstípusok–SNV-k, inzerciók és deléciók–esetében. A referenciapozíciók nem szerepelnek az elemzésben.

15 táblázat Csírvonalbeli eredmények egyezése minták szerint, variánstípusok szerint

| Minta | SVN-k | | | Inzerciók | | | Deléciók | | |
|---------|--------|----------------|-----------|-----------|----------------|-----------|----------|----------------|-----------|
| | Várt | Valódi pozitív | Álnegatív | Várt | Valódi pozitív | Álnegatív | Várt | Valódi pozitív | Álnegatív |
| NA12877 | 255096 | 254877 | 219 | 10368 | 10367 | 1 | 8208 | 8208 | 0 |
| NA12878 | 250344 | 250077 | 221 | 8424 | 8424 | 0 | 6912 | 6707 | 13 |
| NA12879 | 246024 | 246024 | 0 | 8856 | 8856 | 0 | 6912 | 6912 | 0 |
| NA12880 | 229482 | 229086 | 396 | 9306 | 9306 | 0 | 7326 | 7159 | 3 |

A mintákat tovább elemezték a kis inzerciók és deléciók (indelek) azonosítása érdekében. Az átfogó összefoglalást a [A csírvonalbeli indelek kimutatásának összefoglalása a\(z\) 40. oldal](#) tartalmazza. Összesen 210 olyan indelt találtak, amelyek mérete az inzerciók esetében 1–18 bp, illetve a deléciók esetében 1–21 bp volt.

16 táblázat A csírvonalbeli indelek kimutatásának összefoglalása

| Variáns típusa | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | PPA |
|----------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|--------|
| Inzerció | 36954 | 36953 | 1 | 0 | > 99,9 |
| Deléció | 29358 | 28986 | 16 | 356 | 99,9 |

A reprezentatív vizsgálat 9232 célgénből állt, amelyek többféle genomiális tartalmakat lefednek. A célgének GC-tartalma 0,20–0,86 között volt. A célgének többféle, egyszerű nukleotidot (például poliA, poliT), dinukleotidot és trinukleotidot tartalmazó ismétlődést is tartalmaztak. A genomikai tartalomnak a helyes azonosítások százalékos arányára gyakorolt hatásának meghatározásához a kromoszómánkénti alapon összeállított adatok a [Csírvonal kromoszómaszintű pontosság a\(z\) 40. oldalon](#) című fejezetben vannak megadva. A helyes azonosítások százalékos aránya a variáns- és referenciaazonosításokat is tartalmazza, és hibás vagy sikertelen azonosítás esetén kisebb mint 100%.

17 táblázat Csírvonal kromoszómaszintű pontosság

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|-------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. kr. | 47 | 728 | 138328 | Poli-A (12), poli-C (7), poli-T (14), poli-G (7), dinukleotid (22), trinukleotid (8), inzerció (18), deléció (4) | [0,22 – 0,8]; Medián: 0,51 | 114888718 | 34 | 966860 | > 99,9 | 0,83 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 2. kr. | 39 | 628 | 159588 | Poli-A (46), poli-C (8), poli-T (23), poli-G (7), dinukleotid (22), trinukleotid (8), inzerció (5), deléció (2) | [0,24 – 0,81]; Medián: 0,44 | 132293464 | 798 | 460345 | > 99,9 | 0,35 |
| 3. kr. | 38 | 650 | 137627 | Poli-A (18), poli-C (6), poli-T (18), poli-G (7), dinukleotid (12), trinukleotid (6), inzerció (11), deléció (1) | [0,25 – 0,86]; Medián: 0,45 | 114625053 | 2 | 226461 | > 99,9 | 0,20 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 4. kr. | 17 | 370 | 73766 | Poli-A (9), poli-C (7), poli-T (25), poli-G (6), dinukleotid (5), trinukleotid (5), inzerció (2), deléció (2) | [0,27 – 0,77]; Medián: 0,45 | 61872303 | 0 | 66741 | 100 | 0,11 |
| 5. kr. | 25 | 507 | 90008 | Poli-A (10), poli-C (6), poli-T (12), poli-G (7), dinukleotid (10), trinukleotid (8), inzerció (8), deléció (18) | [0,29 – 0,79]; Medián: 0,46 | 75314497 | 912 | 153061 | > 99,9 | 0,20 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 6. kr. | 39 | 453 | 126721 | Poli-A (28), poli-C (7), poli-T (33), poli-G (7), dinukleotid (18), trinukleotid (11), inzerció (4), deléció (2) | [0,24 – 0,79]; Medián: 0,48 | 103412695 | 1 | 182361 | > 99,9 | 0,18 |
| 7. kr. | 21 | 450 | 161501 | Poli-A (27), poli-C (8), poli-T (21), poli-G (7), dinukleotid (31), trinukleotid (5), inzerció (1), deléció (4) | [0,2 – 0,77]; Medián: 0,46 | 132534074 | 19 | 246884 | > 99,9 | 0,19 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 8. kr. | 18 | 381 | 67775 | Poli-A (19), poli-C (7), poli-T (13), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (9), inzerció (4), deléció (1) | [0,26 – 0,78]; Medián: 0,47 | 56247612 | 411 | 170925 | > 99,9 | 0,30 |
| 9. kr. | 23 | 347 | 87100 | Poli-A (12), poli-C (7), poli-T (27), poli-G (8), dinukleotid (9), trinukleotid (9), inzerció (4), deléció (1) | [0,27 – 0,83]; Medián: 0,49 | 72650800 | 20 | 241991 | > 99,9 | 0,33 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 10. kr. | 14 | 317 | 66723 | Poli-A (26), poli-C (7), poli-T (15), poli-G (6), dinukleotid (16), trinukleotid (6), inzerció (1), deléció (1) | [0,23 – 0,78]; Medián: 0,44 | 55539058 | 1 | 188216 | > 99,9 | 0,34 |
| 11. kr. | 29 | 511 | 91786 | Poli-A (28), poli-C (8), poli-T (21), poli-G (7), dinukleotid (26), trinukleotid (7), inzerció (2), deléció (2) | [0,28 - 0,8]; Medián: 0,47 | 75744222 | 742 | 259258 | > 99,9 | 0,34 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 12. kr. | 29 | 577 | 120365 | Poli-A (19), poli-C (8), poli-T (40), poli-G (7), dinukleotid (7), trinukleotid (7), inzerció (1), deléció (5) | [0,26 – 0,77]; Medián: 0,49 | 99972530 | 1 | 542005 | > 99,9 | 0,54 |
| 13. kr. | 13 | 283 | 58639 | Poli-A (24), poli-C (6), poli-T (12), poli-G (7), dinukleotid (6), trinukleotid (8), inzerció (14), deléció (0) | [0,28 – 0,79]; Medián: 0,42 | 48503179 | 1 | 45666 | > 99,9 | 0,09 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 14. kr. | 11 | 147 | 26980 | Poli-A (21), poli-C (6), poli-T (18), poli-G (11), dinukleotid (6), trinukleotid (6), inzerció (4), deléció (1) | [0,29 – 0,77]; Medián: 0,47 | 22286153 | 198 | 147895 | > 99,9 | 0,66 |
| 15. kr. | 15 | 266 | 52091 | Poli-A (26), poli-C (7), poli-T (13), poli-G (6), trinukleotid (8), inzerció (4), deléció (6) | [0,29 – 0,76]; Medián: 0,46 | 43600279 | 0 | 99041 | 100 | 0,23 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|-----------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 16. kr. | 21 | 366 | 80030 | Poli-A (7), poli-C (7), poli-T (15), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (10), inzerció (15), deléció (21) | [0,3 – 0,76]; Medián: 0,54 | 65490245 | 16 | 1438278 | > 99,9 | 2,15 |
| 17. kr. | 36 | 645 | 118062 | Poli-A (19), poli-C (7), poli-T (18), poli-G (8), dinukleotid (13), trinukleotid (6), inzerció (18), deléció (16) | [0,28 – 0,82]; Medián: 0,49 | 97929929 | 417 | 335905 | > 99,9 | 0,34 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 18. kr. | 9 | 99 | 19195 | Poli-A (7), poli-C (7), poli-T (15), poli-G (6), trinukleotid (10), inzerció (4), deléció (0) | [0,22 – 0,78]; Medián: 0,44 | 15967171 | 312 | 42077 | > 99,9 | 0,26 |
| 19. kr. | 30 | 605 | 104004 | Poli-A (19), poli-C (7), poli-T (31), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (7), inzerció (2), deléció (21) | [0,33 – 0,83]; Medián: 0,59 | 85642066 | 3 | 678213 | > 99,9 | 0,79 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 20. kr. | 12 | 179 | 33795 | Poli-A (6), poli-C (6), poli-T (7), poli-G (8), trinukleotid (9), inzerció (5), deléció (0) | [0,31 – 0,84]; Medián: 0,53 | 28108712 | 0 | 38374 | 100 | 0,14 |
| 21. kr. | 5 | 63 | 30642 | Poli-A (28), poli-C (6), poli-T (24), poli-G (7), dinukleotid (5), inzerció (2), deléció (5) | [0,22 – 0,78]; Medián: 0,52 | 25319736 | 50 | 57434 | > 99,9 | 0,23 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 22. kr. | 10 | 187 | 36727 | Poli-A (26), poli-C (7), poli-T (19), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (6), inzerció (6), deléció (0) | [0,27 – 0,74]; Medián: 0,51 | 30258131 | 0 | 42673 | 100 | 0,14 |
| X. kr. | 23 | 433 | 83576 | Poli-A (18), poli-C (8), poli-T (23), poli-G (9), dinukleotid (5), trinukleotid (23), inzerció (3), deléció (0) | [0,2 – 0,72]; Medián: 0,48 | 67318722 | 0 | 770544 | 100 | 1,13 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|----------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Y. kr. | 0 | 40 | 5476 | Poli-A (11), poli-C (8), poli-T (11), poli-G (5), inzerció (0), deléció (0) | [0,4 – 0,59]; Medián: 0,45 | 0 | 0 | 0 | NA | NA |

Az NA12878 minta szekvenálási eredményeit összehasonlították a National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) által az NA12878-ra megállapított, nagy konfidenciájú genotípussal. A 9232 célgénből 8009 célgén teljes egészében a nagy konfidenciával azonosított genomikai régiókban volt, 776 célgén részleges átfedést mutatott az ilyen területekkel, 447 célgén pedig nem volt átfedésben a NIST által meghatározott szekvenciákkal. Ismétlésenként 1 831 483 koordináta adatait határozták meg összehasonlítás céljából. A nem variáns bázisazonosításokat a humán genom hg19-es referenciaszekvenciájával hasonlították össze. A pontossági eredményeket a [Az NA12878 minta NIST adatbázissal való csírvonalbeli egyezése a\(z\) 52. oldalon](#) című fejezet tartalmazza.

18 táblázat Az NA12878 minta NIST adatbázissal való csírvonalbeli egyezése

| Minta | Lefedett célgének száma | Autoszomás azonosítási lehetőség | Valódi pozitív | Álnegatív | Valódi negatív | Álpozitív | PPA | NPA | OPA |
|---------|-------------------------|----------------------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|--------|--------|--------|
| NA12878 | 8785 | 99,4 | 247709 | 218 | 394262149 | 4584 | > 99,9 | > 99,9 | > 99,9 |

A 18 futtatásból álló csírvonal vizsgálat adatai alapján a NovaSeq 6000Dx Instrument konzisztens szekvenálást tud végezni az alábbi feltételek teljesülése esetén:

- GC-tartalom $\geq 20\%$ (aZ 1692 szekvenált, 20% GC-tartalmú cél régió összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0% sikertelen azonosítás mellett)
- GC-tartalom $\leq 86\%$ (a 846 szekvenált, 86% GC-tartalmú cél régió összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0% sikertelen azonosítás mellett)

- PoliA hosszak ≤ 46 (a poliA 46-szoros ismétlését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 0,27% sikertelen azonosítás mellett)
- PoliT hosszak ≤ 40 (a poliT 40-szeres ismétlését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban 13 384 321 azonosított bázisból 13 384 074 azonosítása helyes volt, 0,26% sikertelen azonosítás mellett)
- PoliG hosszak ≤ 11 (a poliG 11-szeres ismétlését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 0% sikertelen azonosítás mellett)
- PoliC hosszak ≤ 8 (a poliC 8-szoros ismétlődését tartalmazó 5922 szekvenált cél régióban 9 815 035 azonosított bázisból 9 815 030 azonosítása helyes volt, 0,53% sikertelen azonosítás mellett)
- A dinukleotid ismétlődésének hosszúsága $\leq 31x$ (a dinukleotid 31-szeres ismétlődését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban 32 233 926 azonosított bázisból 32 233 922 azonosítása helyes volt, 0,21% sikertelen azonosítás mellett)
- A trinukleotid ismétlődésének hosszúsága $\leq 23x$ (a trinukleotid 23-szoros ismétlődését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 0,21% sikertelen azonosítás mellett)
- Inzerciók hosszak ≤ 18 (a 18 inzerciót tartalmazó 1692 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 7,71% sikertelen azonosítás mellett)
- Deléciók hosszak ≤ 21 (a 21 delécióit tartalmazó 1692 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 1,14% sikertelen azonosítás mellett)

Szomatikus

Az itt leírt vizsgálatot a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás szomatikus FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatának variánsazonosító pontosságának értékelésére használták a NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken a NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) segítségével.

A reprezentatív vizsgálatban mind a 23 humán kromoszómán található, összesen 1 970 505 bázist tartalmazó különböző géneket (9232 célgént) olvastak le. FFPE-kezelt blokkokból Platinum Genome DNS kivonásával négy egyedi mintát hoztak létre a vizsgálatban való értékeléshez.

A GM12877 minta DNS-ét a GM12878 minta DNS-ével hígították, létrehozva a GM12877-13 mintát, amelyek közel 6,5%-os, illetve 13%-os gyakorisággal tartalmaztak egyedi GM12877 heterozigóta és homozigóta variánsokat. A GM12878 minta DNS-ét hasonlóan hígították a GM12877 minta DNS-ével, létrehozva a GM12878-13 mintát, amelyek közel 6,5%-os, illetve 13%-os gyakorisággal tartalmaztak egyedi GM12878 heterozigóta és homozigóta variánsokat. Hígítatlan GM12877 és GM12878 mintákat is teszteltek. Mindegyik mintát 12 replikátummal tesztelték, kivéve a hígítatlan GM12878-at, amelyet tizenegy replikátummal teszteltek. Összesen tizennyolc futtatást

végeztek három szekvenálókészülékkel, három S4 reagenstétellel, két kezelővel és hat különböző indítási napon történő kezdéssel. Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával.

19 táblázat A szomatikus eredmények egyezésének összefoglalása

| Kritérium | Megfigyelések száma ¹ | Megfigyelések eredménye ² | Eredmény futtatás szerint ³ |
|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--|
| PPA szomatikus SNV-khez | 846 | 99,8 | 98,9 |
| PPA szomatikus inzerciókhoz | 846 | 100 | 100 |
| PPA szomatikus deléciókhoz | 846 | 100 | 100 |
| NPA | 846 | > 99,9 | > 99,9 |
| OPA | 846 | > 99,9 | > 99,9 |

¹ A következőképpen számítva: = minták száma futtatásonként (47) x futtatások száma (18) = 846.

² A legalacsonyabb megfigyelt érték az egyes mintareplikátumok mind a 18 futtatásból kapott adataiból.

³ A legalacsonyabb érték az egyes futtatások adatainak összesített elemzésével.

A *Szomatikus eredmények egyezése minták szerint a(z) 54. oldalon* tartalmazza a vizsgálat adatait a pozitív és a negatív százalékos egyezéssel együtt, mintánként; a PPA számításához a variáns eredmények a pontosan jellemzett, kombinált referencia-módszerrel összehasonlítva szerepelnek. A három variánstípus (SNV-k, inzerciók és deléciók) eredményeit összevonva mutatjuk be. Mivel a referencia-módszer csak az egynukleotid-variánsokra és az inzerciókra/deléciókra ad eredményt, az NPA-számításhoz a nem variáns bázisszekvenciák a humán genom hg19 referenciaszekvenciájával vannak összehasonlítva.

20 táblázat Szomatikus eredmények egyezése minták szerint

| Minta | Autoszomás azonosítási lehetőség | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | Valódi negatív | Álpozitív | PPA | NPA | OPA |
|------------|----------------------------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|----------------|-----------|------|--------|--------|
| GM12877 | 95,4 | 96228 | 95022 | 198 | 1008 | 365425810 | 1203 | 99,8 | > 99,9 | > 99,9 |
| GM12878 | 94,5 | 96768 | 96278 | 0 | 490 | 395002023 | 1278 | 100 | > 99,9 | > 99,9 |
| GM12877-13 | 94,7 | 104976 | 103029 | 216 | 1731 | 395989324 | 1286 | 99,8 | > 99,9 | > 99,9 |

| Minta | Autoszomás azonosítási lehetőség | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | Valódi negatív | Álpozitív | PPA | NPA | OPA |
|------------|----------------------------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|----------------|-----------|-----|--------|--------|
| GM12878-13 | 95,2 | 96768 | 96027 | 0 | 741 | 397900884 | 1218 | 100 | > 99,9 | > 99,9 |

[Szomatikus eredmények egyezése minták szerint, variánstípusok szerint a\(z\) 55. oldalon](#) tartalmazza a vizsgálat adatait mintánként; a variáns eredmények a pontosan jellemzett, kombinált referencia-módszerrel összehasonlítva szerepelnek. A kimutatást külön értékelték az egyes variánstípusok–SNV-k, inzerciók és deléciók–esetében. A referenciapozíciók nem szerepelnek az elemzésben.

21 táblázat Szomatikus eredmények egyezése minták szerint, variánstípusok szerint

| Minta | SNV-k | | | Inzerciók | | | Deléciók | | |
|------------|-------|----------------|-----------|-----------|----------------|-----------|----------|----------------|-----------|
| | Várt | Valódi pozitív | Álnegatív | Várt | Valódi pozitív | Álnegatív | Várt | Valódi pozitív | Álnegatív |
| GM12877 | 89694 | 88488 | 198 | 3564 | 3564 | 0 | 2970 | 2970 | 0 |
| GM12878 | 92664 | 92390 | 0 | 2160 | 2160 | 0 | 1944 | 1728 | 0 |
| GM12877-13 | 97848 | 95901 | 216 | 3888 | 3888 | 0 | 3240 | 3240 | 0 |
| GM12878-13 | 92664 | 92139 | 0 | 2160 | 2160 | 0 | 1944 | 1728 | 0 |

A négy mintát tovább elemezték a kis inzerciók és deléciók (indelek) azonosítása érdekében. Az átfogó összefoglalást a [A szomatikus indelek kimutatásának összefoglalása a\(z\) 55. oldalon](#) tartalmazza. Összesen 210 olyan indelt találtak, amelyek mérete az inzerciók esetében 1–18 bp, illetve a deléciók esetében 1–21 bp volt.

22 táblázat A szomatikus indelek kimutatásának összefoglalása

| Variáns típusa | Várt variánsok száma | Valódi pozitív | Álnegatív | Variáns azonosításának hiánya | PPA |
|----------------|----------------------|----------------|-----------|-------------------------------|-----|
| Inzerció | 11772 | 11772 | 0 | 0 | 100 |
| Deléció | 10098 | 9666 | 0 | 432 | 100 |

A reprezentatív vizsgálat 9232 célgénből állt, amelyek többféle genomiális tartalmakat lefednek. A célgének GC-tartalma 0,20–0,86 között volt. A célgének többféle, egyszerű nukleotidot (például poliA, poliT), dinukleotidot és trinukleotidot tartalmazó ismétlődést is tartalmaztak. A genomikai tartalomnak a helyes azonosítások százalékos arányára gyakorolt hatásának meghatározásához a kromoszómánkénti alapon összeállított adatok a [Szomatikus kromoszómaszintű pontosság a\(z\) 56. oldalon](#) című fejezetben vannak megadva. A helyes azonosítások százalékos aránya a variáns- és referenciaazonosításokat is tartalmazza, és hibás vagy sikertelen azonosítás esetén kisebb mint 100%.

23 táblázat Szomatikus kromoszómaszintű pontosság

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|-------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. kr. | 47 | 728 | 138328 | Poli-A (12), poli-C (7), poli-T (14), poli-G (7), dinukleotid (22), trinukleotid (8), inzerció (3), deléció (0) | [0,22 – 0,8]; Medián: 0,51 | 110145939 | 52 | 5642613 | > 99,9 | 4,9 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|-----------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 2. kr. | 39 | 628 | 159588 | Poli-A (46), poli-C (8), poli-T (23), poli-G (7), dinukleotid (22), trinukleotid (8), inzerció (5), deléció (1) | [0,24 – 0,81]; Medián: 0,44 | 126795713 | 842 | 5850393 | > 99,9 | 4,4 |
| 3. kr. | 38 | 650 | 137627 | Poli-A (18), poli-C (6), poli-T (18), poli-G (7), dinukleotid (12), trinukleotid (6), inzerció (1), deléció (1) | [0,25 – 0,86]; Medián: 0,45 | 109902527 | 593 | 4889226 | > 99,9 | 4,3 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 4. kr. | 17 | 370 | 73766 | Poli-A (9), poli-C (7), poli-T (25), poli-G (6), dinukleotid (5), trinukleotid (5), inzerció (0), deléció (1) | [0,27 – 0,77]; Medián: 0,45 | 59373461 | 16 | 2517412 | > 99,9 | 4,1 |
| 5. kr. | 25 | 507 | 90008 | Poli-A (10), poli-C (6), poli-T (12), poli-G (7), dinukleotid (10), trinukleotid (8), inzerció (8), deléció (18) | [0,29 – 0,79]; Medián: 0,46 | 72261191 | 723 | 3116981 | > 99,9 | 4,1 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 6. kr. | 39 | 453 | 126721 | Poli-A (28), poli-C (7), poli-T (33), poli-G (7), dinukleotid (18), trinukleotid (11), inzerció (0), deléció (1) | [0,24 – 0,79]; Medián: 0,48 | 98593101 | 687 | 4890221 | > 99,9 | 4,7 |
| 7. kr. | 21 | 450 | 161501 | Poli-A (27), poli-C (8), poli-T (21), poli-G (7), dinukleotid (31), trinukleotid (5), inzerció (1), deléció (4) | [0,2 – 0,77]; Medián: 0,46 | 126913574 | 104 | 5773856 | > 99,9 | 4,4 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 8. kr. | 18 | 381 | 67775 | Poli-A (19), poli-C (7), poli-T (13), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (9), inzerció (4), deléció (0) | [0,26 – 0,78]; Medián: 0,47 | 53430489 | 175 | 2958909 | > 99,9 | 5,2 |
| 9. kr. | 23 | 347 | 87100 | Poli-A (12), poli-C (7), poli-T (27), poli-G (8), dinukleotid (9), trinukleotid (9), inzerció (0), deléció (1) | [0,27 – 0,83]; Medián: 0,49 | 69594586 | 74 | 3260257 | > 99,9 | 4,5 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 10. kr. | 14 | 317 | 66723 | Poli-A (26), poli-C (7), poli-T (15), poli-G (6), dinukleotid (16), trinukleotid (6), inzerció (0), deléció (0) | [0,23 – 0,78]; Medián: 0,44 | 53209592 | 90 | 2469444 | > 99,9 | 4,4 |
| 11. kr. | 29 | 511 | 91786 | Poli-A (28), poli-C (8), poli-T (21), poli-G (7), dinukleotid (26), trinukleotid (7), inzerció (2), deléció (2) | [0,28 – 0,8]; Medián: 0,47 | 72291795 | 150 | 3665560 | > 99,9 | 4,8 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 12. kr. | 29 | 577 | 120365 | Poli-A (19), poli-C (8), poli-T (40), poli-G (7), dinukleotid (7), trinukleotid (7), inzerció (0), deléció (3) | [0,26 – 0,77]; Medián: 0,49 | 96109352 | 101 | 4331932 | > 99,9 | 4,3 |
| 13. kr. | 13 | 283 | 58639 | Poli-A (24), poli-C (6), poli-T (12), poli-G (7), dinukleotid (6), trinukleotid (8), inzerció (14), deléció (0) | [0,28 – 0,79]; Medián: 0,42 | 46130028 | 44 | 2384839 | > 99,9 | 4,9 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 14. kr. | 11 | 147 | 26980 | Poli-A (21), poli-C (6), poli-T (18), poli-G (11), dinukleotid (6), trinukleotid (6), inzerció (4), deléció (0) | [0,29 – 0,77]; Medián: 0,47 | 21336891 | 0 | 1078329 | 100 | 4,8 |
| 15. kr. | 15 | 266 | 52091 | Poli-A (26), poli-C (7), poli-T (13), poli-G (6), trinukleotid (8), inzerció (4), deléció (0) | [0,29 – 0,76]; Medián: 0,46 | 41918631 | 184 | 1753300 | > 99,9 | 4,0 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|-----------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 16. kr. | 21 | 366 | 80030 | Poli-A (7), poli-C (7), poli-T (15), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (10), inzerció (15), deléció (21) | [0,3 – 0,76]; Medián: 0,54 | 62344351 | 18 | 4540539 | > 99,9 | 6,8 |
| 17. kr. | 36 | 645 | 118062 | Poli-A (19), poli-C (7), poli-T (18), poli-G (8), dinukleotid (13), trinukleotid (6), inzerció (18), deléció (1) | [0,28 – 0,82]; Medián: 0,49 | 93811318 | 414 | 4403622 | > 99,9 | 4,5 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 18. kr. | 9 | 99 | 19195 | Poli-A (7), poli-C (7), poli-T (15), poli-G (6), trinukleotid (10), inzerció (0), deléció (0) | [0,22 – 0,78]; Medián: 0,44 | 15007653 | 6 | 990633 | > 99,9 | 6,2 |
| 19. kr. | 30 | 605 | 104004 | Poli-A (19), poli-C (7), poli-T (31), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (7), inzerció (2), deléció (3) | [0,33 – 0,83]; Medián: 0,59 | 81416722 | 455 | 4860311 | > 99,9 | 5,6 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 20. kr. | 12 | 179 | 33795 | Poli-A (6), poli-C (6), poli-T (7), poli-G (8), trinukleotid (9), inzerció (5), deléció (0) | [0,31 – 0,84]; Medián: 0,53 | 26833936 | 7 | 1301905 | > 99,9 | 4,6 |
| 21. kr. | 5 | 63 | 30642 | Poli-A (28), poli-C (6), poli-T (24), poli-G (7), dinukleotid (5), inzerció (1), deléció (0) | [0,22 – 0,78]; Medián: 0,52 | 24169250 | 44 | 1172087 | > 99,9 | 4,6 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 22. kr. | 10 | 187 | 36727 | Poli-A (26), poli-C (7), poli-T (19), poli-G (7), dinukleotid (5), trinukleotid (6), inzerció (6), deléció (0) | [0,27 – 0,74]; Medián: 0,51 | 28887217 | 86 | 1392179 | > 99,9 | 4,6 |
| X. kr. | 23 | 433 | 83576 | Poli-A (18), poli-C (8), poli-T (23), poli-G (9), dinukleotid (5), trinukleotid (23), inzerció (3), deléció (0) | [0,2 – 0,72]; Medián: 0,48 | 64231080 | 241 | 3852253 | > 99,9 | 5,7 |

| Kromoszóma | Gének száma | Célgének száma | Bázisok száma | Genomikai tartalom | GC-tartomány | Helyes azonosítások | Helytelen azonosítások | Nincs azonosítás | Helyes azonosítások százalékos aránya | Nem azonosítottak százalékos aránya |
|------------|-------------|----------------|---------------|---|-------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Y. kr. | 0 | 40 | 5476 | Poli-A (11), poli-C (8), poli-T (11), poli-G (5), inzerció (0), deléció (0) | [0,4 – 0,59]; Medián: 0,45 | 0 | 0 | 0 | NA | NA |

A GM12878 minta szekvenálási eredményeit összehasonlították a National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) által az NA12878-ra megállapított, nagy konfidenciájú genotípussal. A 9232 célgénből 8009 célgén teljes egészében a nagy konfidenciával azonosított genomikai régiókban volt, 776 célgén részleges átfedést mutatott az ilyen területekkel, 447 célgén pedig nem volt átfedésben a NIST által meghatározott szekvenciákkal. Ismétlésenként 1 831 483 koordináta adatait határozták meg összehasonlítás céljából. A nem variáns bázisazonosításokat a humán genom hg19-es referenciaszekvenciájával hasonlították össze. A pontossági eredményeket a [A GM12878 minta szomatikus eredményeinek egyezése az NIST adatbázissal a\(z\) 68. oldalon](#) című fejezet tartalmazza.

24 táblázat A GM12878 minta szomatikus eredményeinek egyezése az NIST adatbázissal

| Minta | Lefedett célgének száma | Autoszomás azonosítási lehetőség | Valódi pozitív | Álnegatív | Valódi negatív | Álpozitív | PPA | NPA | OPA |
|---------|-------------------------|----------------------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|-----|--------|--------|
| GM12878 | 8785 | 94,5 | 247228 | 0 | 375073821 | 2043 | 100 | > 99,9 | > 99,9 |

A 18 futtatásból álló szomatikus vizsgálat adatai alapján a NovaSeq 6000Dx Instrument készülék konzisztens szekvenálást tud végezni az alábbi feltételek teljesülése esetén:

- GC-tartalom $\geq 20\%$ (az 1692 szekvenált, 20% GC-tartalmú célregió összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,34% sikertelen azonosítás mellett)
- GC-tartalom $\leq 86\%$ (a 846 szekvenált, 86% GC-tartalmú célregió összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 4,21% sikertelen azonosítás mellett)

- PoliA hosszak ≤ 46 (a poliA 46-szoros ismétlését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban 14 550 083 azonosított bázisból 14 550 082 azonosítása helyes volt, 4,18% sikertelen azonosítás mellett)
- PoliT hosszak ≤ 40 (a poliT 40-szeres ismétlését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban 12 833 491 azonosított bázisból 12 833 489 azonosítása helyes volt, 4,37% sikertelen azonosítás mellett)
- PoliG hosszak ≤ 11 (a poliG 11-szeres ismétlését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 7,59% sikertelen azonosítás mellett)
- PoliC hosszak ≤ 8 (a poliC 8-szoros ismétlődését tartalmazó 5922 szekvenált cél régióban 9 405 615 azonosított bázisból 9 405 604 azonosítása helyes volt, 4,68% sikertelen azonosítás mellett)
- A dinukleotid ismétlődésének hosszúsága $\leq 31x$ (a dinukleotid 31-szeres ismétlődését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban 30 996 712 azonosított bázisból 30 996 684 azonosítása helyes, 4,04% sikertelen azonosítás mellett)
- A trinukleotid ismétlődésének hosszúsága $\leq 23x$ (a trinukleotid 23-szoros ismétlődését tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 5,39% sikertelen azonosítás mellett)
- Inzerciók hosszak ≤ 18 (a 18 inzerciót tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 1,44% sikertelen azonosítás mellett)
- Deléciók hosszak ≤ 21 (a 21 delécióval tartalmazó 846 szekvenált cél régióban az összes azonosított bázis azonosítása helyes volt, 7,86% sikertelen azonosítás mellett)

Precizitás

A NovaSeq 6000Dx Instrument esetén a pontosságot Platinum Genome mintákon értékelték egy reprezentatív vizsgálattal, amelyet úgy terveztek, hogy különböző génekre kérdezzenek rá, amelyek 9232 cél-oligonukleotidban, 23 különböző kromoszómán 1 970 505 bázist fednek le. Összesen 1723 célzott kis variánst (SNV-eket, inzerciókat és deléciókat) értékelték. A csírvonal-vizsgálat négy egyedi Platinum Genome minta tizenegy vagy tizenkét replikátumából állt. A szomatikus vizsgálat négy egyedi FFPE-kezelt Platinum Genome minta tizenegy vagy tizenkét replikátumából állt különböző VAF-szinteken. A mintakönyvtárakat Illumina DNA Prep with Enrichment Dx készletreagensekkel készítették elő.

A tesztelést egy belső helyszínen végezték, három NovaSeq 6000Dx Instrument készülékkel, NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) három-három tételének használatával, és két kezelővel hat indítási napon keresztül. Az egyik műszeroldalon a csírvonal mintakönyvtárakat S2 reagensekkel és a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csírvonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatával szekvenálták, a másik műszeroldalon pedig a szomatikus mintakönyvtárakat S4 reagensekkel és a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás Szomatikus FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatával minden kezdőnapra sorba rendezték. Így összesen 18 áramlási cella készült mind a csírvonal, mind a szomatikus munkafolyamat esetében.

Csírvonal

A csírvonal-futtatások esetében a megcélzott csírvonal-variánst észlelő genomikai helyeket pozitívként (variánsként) kell jelenteni. A várhatóan pozitív csírvonalbeli variánsok esetében az egyes variánstípusokon (SNV, inzerció, deléción) belül értékelték a sikertelen azonosítási arányt és a százalékos pozitív azonosítást (PPC). A [Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos csírvonalbeli azonosítási megfigyelések variánstípusonként a\(z\) 70. oldalon](#) összefoglalja a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL), mindegyik variánstípus esetén.

25 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos csírvonalbeli azonosítási megfigyelések variánstípusonként

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt pozitív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PPC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|-------|----------------------|---------|
| SNV | 6 | 980316 | < 0,01 | 979854 | 980310 | 99,95 | 99,95 | 99,96 |
| Inzerció | 0 | 36738 | 0 | 36738 | 36738 | 100 | > 99,99 | 100 |
| Deléción | 18 | 34434 | 0,05 | 32160 | 34416 | 93,44 | 93,18 | 93,70 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² A Pozitív azonosítás meghatározás szerint egy olyan kromoszómapozíció, ahol variáns észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Azokat a genomikai helyeket, ahol nem észlelhető célzott variáns, negatívként (vad típusként) kell jelenteni. A várhatóan negatív helyeken a sikertelen azonosítási arányt és a százalékos negatív azonosítást (PNC) értékelték. A [Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos csírvonalbeli azonosítási megfigyelések a\(z\) 71. oldalon](#) összefoglalja a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL).

26 táblázat Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos csírvonalbeli azonosítási megfigyelések

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt negatív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PNC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|-----|----------------------|---------|
| Vad típusú | 0 | 406170 | 0 | 406170 | 406170 | 100 | > 99,99 | 100 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² Negatív azonosítás, amely olyan célzott kromoszómapozícióként határozható meg, ahol variáns nem észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Az egyes paraméterek (műszer, reagenstétel, nap, könyvtár-replikátum) hozzájárulását a teljes variabilitáshoz a varianciakomponens elemzésével határozták meg, a válasz változójaként a variánsgyakoriságot használva. A teljes szórás átlaga 0,0370 volt. A variánsgyakoriság variabilitását leginkább a könyvtár-előkészítési replikátumok segítették elő, amelyek a teljes variabilitás 17,1%-ához járultak hozzá. A nap 1%-hoz járult hozzá, míg a műszer- és reagenstételek [A laboratóriumon belüli pontossági eltérés komponenseinek becslései a csírvonal-mintavariánsok gyakoriságára vonatkozóan a\(z\) 71. oldalon](#) (SD = szórás) teljes variabilitásának kevesebb mint 1%-ához járult hozzá.

27 táblázat A laboratóriumon belüli pontossági eltérés komponenseinek becslései a csírvonal-mintavariánsok gyakoriságára vonatkozóan

| Komponens | Átlagos szórás | A teljes szórás átlagos %-a |
|---------------------|----------------|-----------------------------|
| Nap | 0,0020 | 1,028 |
| Készülék | 0,0018 | 0,837 |
| Fogyóeszköz-tétel | 0,0016 | 0,712 |
| Könyvtár-replikátum | 0,0143 | 17,110 |
| Összes | 0,0370 | 100 |

Szomatikus

A szomatikus futtatások esetében a megcélzott szomatikus variánst észlelő genomikai helyeket pozitívként (variánsként) kell jelenteni. A GM12877-13 és GM12878-13 hígított minták esetén, melyeknél a várt pozitív szomatikus variánsok VAF-en 6,5% és 13% között vannak, az adatokat az egyes variánstípusokon (SNV,

inzerció, deléció) belül értékelték a nem azonosítható arány és a százalékos pozitív azonosítás (PPC) szempontjából. A [Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos szomatikus azonosítási megfigyelések variánstípusonként \(VAF \$\geq 6,5\%\$ és \$\leq 13\%\$ \) a\(z\) 72. oldalon](#) összefoglalja a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL), mindegyik variánstípus esetén.

28 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos szomatikus azonosítási megfigyelések variánstípusonként (VAF $\geq 6,5\%$ és $\leq 13\%$)

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt pozitív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PPC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|-------|----------------------|---------|
| SNV | 0 | 96939 | 0 | 96069 | 96939 | 99,10 | 99,04 | 99,16 |
| Inzerció | 0 | 3004 | 0 | 3004 | 3004 | 100 | 99,87 | 100 |
| Deléció | 0 | 2912 | 0 | 2907 | 2912 | 99,83 | 99,60 | 99,93 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² A Pozitív azonosítás meghatározás szerint egy olyan kromoszómapozíció, ahol variáns észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Azokat a genomikai helyeket, ahol nem észlelhető célzott szomatikus variáns, negatívként (vad típusként) kell jelenteni. A várhatóan negatív helyeken a sikertelen azonosítási arányt és a százalékos negatív azonosításokat értékelték. A [Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos szomatikus azonosítási megfigyelések a\(z\) 72. oldalon](#) foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL) minden variánstípusnál.

29 táblázat Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó, laboron belüli pontos szomatikus azonosítási megfigyelések

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt negatív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PNC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|---------|----------------------|---------|
| Vad típusú | 0 | 194922 | 0 | 194919 | 194922 | > 99,99 | > 99,99 | 100 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² Negatív azonosítás, amely olyan célzott kromoszómapozícióként határozható meg, ahol variáns nem észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Az egyes paraméterek (műszer, reagenstétel, nap, könyvtár-replikátum) hozzájárulását a teljes variabilitáshoz a varianciakomponens elemzésével határozták meg, a válasz változójaként a variánsgyakoriságot használva. A teljes szórás átlaga 0,0062 volt. A könyvtár-előkészítési replikátumok maradtak a legjelentősebb variabilitási források, ami a teljes érték 50,7%-át tette ki. A nap, a műszer- és fogyóeszköz-tételek mindegyike [A](#)

laboratóriumon belüli pontossági eltérés komponenseinek becslései a szomatikus mintavariánsok gyakoriságára vonatkozóan a(z) 73. oldalon (SD = szórás) teljes variabilitásának kevesebb mint 1%-ához járult hozzá.

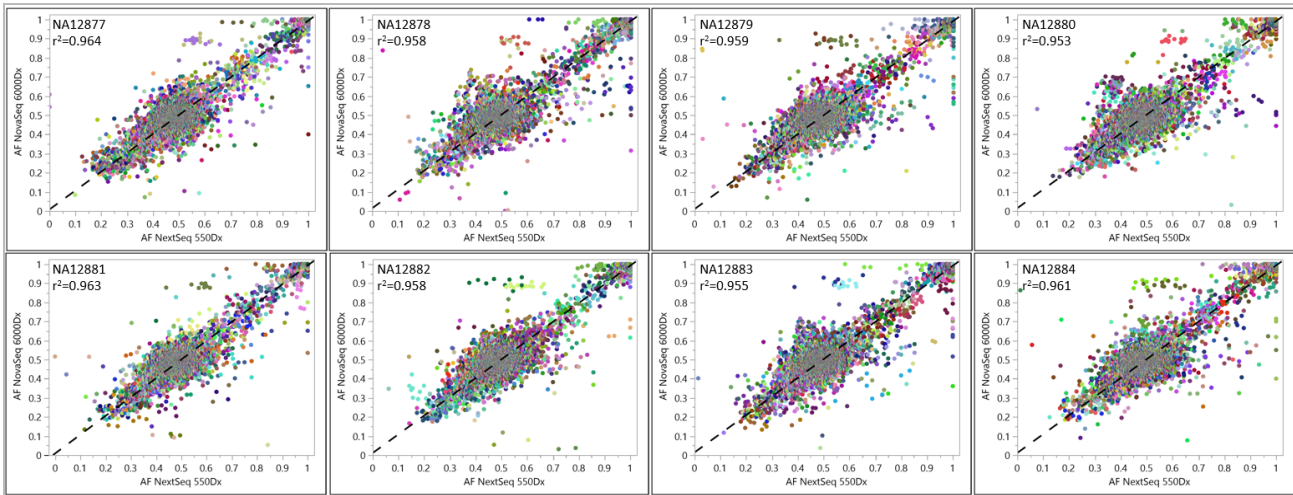
30 táblázat A laboratóriumon belüli pontossági eltérés komponenseinek becslései a szomatikus mintavariánsok gyakoriságára vonatkozóan

| Komponens | Átlagos szórás | A teljes szórás átlagos %-a |
|---------------------|----------------|-----------------------------|
| Nap | 0,0002 | 0,41 |
| Készülék | 0,0002 | 0,40 |
| Fogyóeszköz-tétel | 0,0002 | 0,35 |
| Könyvtár-replikátum | 0,0044 | 50,7 |
| Összes | 0,0062 | 100 |

Módszerek összehasonlítása

Vizsgálatot végeztek a NovaSeq 6000Dx és a NextSeq 550Dx Instruments műszerek teljesítményének összehasonlítására. A vérminták esetében a variánsok gyakorisági egyezését egy reprezentatív vizsgálattal értékelték, amelynek célja az volt, hogy mind a 23 humán kromoszómában 1 970 505 bázist lefedő különböző géneket kérdezzék le. Nyolc Platinum Genome DNS mintát teszteltek, hetet hat replikátummal és egyet (NA12881) öt replikátummal. A könyvtárakat a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csírvonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatának használatával szekvenálták a NovaSeq 6000Dx Instrument készüléken, a NextSeq 550Dx készüléken pedig a DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager modul használatával. *Variánsfrekvencia korrelációs grafikonok (a pontokat egyedi variánsok színezik. A variánsok különböző színűek lehetnek az egyes grafikonokon.) a(z) 74. oldalon* ábrázolják a két műszer közötti VAF-korrelációt minden egyes mintánál. A NovaSeq 6000Dx Instrument és a NextSeq 550Dx készülék közötti erős korreláció miatt a preanalitikai tényezőkkel (például az extrakciós módszerekkel vagy a zavaró anyagokkal) kapcsolatos teljesítményjellemzőkről megállapítható, hogy azonosak a két készülék esetében. További részletekért lásd a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx terméktájékoztatót.

15 ábra Variánsfrekvencia korrelációs grafikonok (a pontokat egyedi variánsok színezik. A variánsok különböző színűek lehetnek az egyes grafikonokon.)



Reprodukálhatóság

A NovaSeq 6000Dx Instrument esetén a reprodukálhatóságot Platinum Genome mintákon értékelték egy reprezentatív vizsgálattal, amelyet úgy terveztek, hogy különböző génekre kérdezzenek rá, amelyek 9232 cél-oligonukleotidban, 23 különböző kromoszómán 1 970 505 bázist fednek le. Összesen 1723 célzott kis variánst (SNV-eket, inzerciókat és deléciókat) értékelték. A csírvonal-vizsgálat tizenkét egyedi Platinum minta három vagy négy replikátumából állt. A szomatikus vizsgálat nyolc egyedi FFPE-kezelt Platinum Genome minta öt vagy hat replikátumából állt különböző VAF-szinteken. A mintakönyvtárakat Illumina DNA Prep with Enrichment Dx készletreagensekkel készítették elő.

A tesztelést három külső helyszínen végezték, egy-egy NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) és NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 készlet (300 ciklus) tétel használatával. Minden helyszínen egy NovaSeq 6000Dx Instrument készüléket használtak. Mindegyik helyszínen két kezelő végezte a vizsgálatokat. Mindegyik kezelő minden mintatípus esetében három, nem egymást követő kezdő nappal végzett vizsgálatokat, a három helyszínen összesen 36 áramlási cellát vizsgált. Az A műszeroldalon a csírvonal mintakönyvtárakat S2 reagensekkel és a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás csírvonal FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatával szekvenálták, a B műszeroldalon pedig a szomatikus mintakönyvtárakat S4 reagensekkel és a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás Szomatikus FASTQ és VCF generációelemzési munkafolyamatával minden kezdőnapra sorba rendezték. Így összesen 18 áramlási cella készült mind a csírvonal, mind a szomatikus munkafolyamat esetében.

Csírvonal

A csírvonal-futtatások esetében a megcélzott csírvonal-variánst észlelő genomikai helyeket pozitívként (variánsként) kell jelenteni. A várhatóan pozitív csírvonalbeli variánsok esetében az egyes variánstípusokon (SNV, inzerció, deléción belül értékelték a sikertelen azonosítási arányt és a százalékos pozitív azonosítást

(PPC). A [Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó csírvonalbeli azonosítási megfigyelések variánstípusonként a\(z\) 75. oldalon](#) foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL), mindegyik variánstípus esetén.

31 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó csírvonalbeli azonosítási megfigyelések variánstípusonként

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt pozitív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PPC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|-------|----------------------|---------|
| SNV | 0 | 991026 | 0 | 990276 | 991026 | 99,92 | 99,92 | 99,93 |
| Inzerció | 0 | 38358 | 0 | 38358 | 38358 | 100 | 99,99 | 100 |
| Deléción | 0 | 34758 | 0 | 32228 | 34758 | 92,72 | 92,44 | 92,99 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² A Pozitív azonosítás meghatározás szerint egy olyan kromoszómapozíció, ahol variáns észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Azokat a genomikai helyeket, ahol nem észlelhető célzott variáns, negatívként (vad típusként) kell jelenteni. A várhatóan negatív helyeken a sikertelen azonosítási arányt és a százalékos negatív azonosítást (PNC) értékelték. A [Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó csírvonalbeli azonosítási megfigyelések a\(z\) 75. oldalon](#) foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL).

32 táblázat Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó csírvonalbeli azonosítási megfigyelések

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt negatív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PNC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|-----|----------------------|---------|
| Vad típusú | 0 | 393516 | 0 | 393516 | 393516 | 100 | > 99,99 | 100 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² Negatív azonosítás, amely olyan célzott kromoszómapozícióként határozható meg, ahol variáns nem észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Szomatikus

A szomatikus futtatások esetében a megcélzott szomatikus variánst észlelő genomikai helyeket pozitívként (variánsként) kell jelenteni. Azoknál a várható pozitív szomatikus variánsoknál, ahol az átlagos variáns allélgyakorisága (VAF) legalább 14%-os, de legfeljebb 28%-os, az adatokat az egyes variánstípusokon (SNV, inzerció, deléción) belül értékelték a nem azonosítható arány és százalékos pozitív azonosítás (PPC) szempontjából. A [Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó, szomatikus azonosítási megfigyelések](#)

variánstípusonként (átlagos VAF $\geq 14\%$ és $\leq 28\%$) a(z) 76. oldalon foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL), mindegyik variánstípus esetén.

33 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó, szomatikus azonosítási megfigyelések variánstípusonként (átlagos VAF $\geq 14\%$ és $\leq 28\%$)

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt pozitív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PPC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|-------|----------------------|---------|
| SNV | 0 | 71028 | 0 | 70314 | 71028 | 98,99 | 98,92 | 99,07 |
| Inzerció | 0 | 1962 | 0 | 1962 | 1962 | 100 | 99,80 | 100 |
| Delécio | 0 | 2142 | 0 | 2098 | 2142 | 97,95 | 97,25 | 98,47 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² A Pozitív azonosítás meghatározás szerint egy olyan kromoszómapozíció, ahol variáns észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Azokat a genomikai helyeket, ahol nem észlelhető célzott szomatikus variáns, negatívként (vad típusként) kell jelenteni. A várhatóan negatív helyeken a sikertelen azonosítási arányt és a százalékos negatív azonosításokat értékelték. A *Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó szomatikus azonosítási megfigyelések a(z) 76. oldalon* foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidenciaszintek alsó és felső határát (LCL/UCL) minden variánstípusnál.

34 táblázat Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó szomatikus azonosítási megfigyelések

| Variáns típusa | Nincs megfigyelt azonosítás ¹ | Azonosítások teljes száma | Nem azonosítás százaléka | Megfigyelt negatív azonosítások ² | Értékelhető azonosítások összesen | PNC | 95% LCL ³ | 95% UCL |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|---------|----------------------|---------|
| Vad típusú | 0 | 92718 | 0 | 92714 | 92718 | > 99,99 | 99,99 | 100 |

¹ A Nincs azonosítás meghatározás szerint az a célzott kromoszómapozíció, ahol a variáns nem határozható meg (az alacsony lefedettség mélység miatt).

² Negatív azonosítás, amely olyan célzott kromoszómapozícióként határozható meg, ahol variáns nem észlelhető.

³ Kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Módosítási előzmények

| Dokumentum | Dátum | Módosítások leírása |
|-------------------------------|-----------------|---------------------|
| Dokumentumszám: 200025284 v00 | 2022. augusztus | Első kiadás. |

Szabadalmak és védjegyek

A jelen dokumentum és annak tartalma az Illumina, Inc. és annak leányvállalatai („Illumina”) tulajdonát képezi, és kizárólag a jelen dokumentumban ismertetett termék(ek) szerződésszerű működtetéséhez használható. Egyéb célokra nem használható. A dokumentum és annak tartalma az Illumina előzetes írásos engedélye nélkül ettől eltérő célokra nem használható és forgalmazható, továbbá semmilyen formában nem kommunikálható, hozható nyilvánosságra vagy reprodukálható. Az Illumina a jelen dokumentummal nem biztosít licenct a termék vásárlójának a harmadik felek szabadalmi, védjegyjogi, szerzői jogi, szokásjogi vagy egyéb oltalom alatt álló jogosultságaihoz.

A jelen dokumentumban szereplő utasításokat a kvalifikált és megfelelően képzett személyzetnek szigorúan be kell tartania az itt ismertetett termék(ek) megfelelő és biztonságos használata érdekében. A termék(ek) használata előtt a felhasználó köteles átolvasni és értelmezni a jelen dokumentumban leírtakat.

AZ ITT SZEREPLŐ INFORMÁCIÓK ELOLVASÁSÁNAK VAGY AZ UTASÍTÁSOK BETARTÁSÁNAK ELMULASZTÁSA ESETÉN A TERMÉK(EK) MEGSÉRÜLHETNEK, ILLETVE SZEMÉLYI SÉRÜLÉS KÖVETKEZHET BE, IDEÉRTVE A FELHASZNÁLÓKAT ÉS MÁSOKAT IS, ILLETVE EGYÉB ANYAGI KÁROK KÖVETKEZHETNEK BE. EZENFELÜL ILYEN ESETEKBE A TERMÉK(EK)RE VONATKOZÓ GARANCIA ÉRVÉNYÉT VESZTI.

AZ ILLUMINA SEMMIFÉLE FELELŐSSÉGET NEM VÁLLAL AZ ITT BEMUTATOTT TERMÉK(EK) HELYTELEN HASZNÁLATÁBÓL FAKADÓ KÁROKÉRT (AZ ALKATRÉSZEKET ÉS A SZOFTVERT IS IDEÉRTVE).

© 2022 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

Minden védjegy az Illumina, Inc., illetve az adott tulajdonosok tulajdonát képezi. A márkanevekkel kapcsolatos információkat lásd a www.illumina.com/company/legal.html internetes oldalon.

Elérhetőségek



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (Észak-Amerikán kívül)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



A termék címkéi

A terméken és a csomagolásán megjelenő címkéken látható szimbólumok teljes magyarázatát megtekintheti a support.illumina.com honlapon az Ön készletére vonatkozó *Documentation* (Dokumentáció) lapon található szimbólum ikonra kattintva.