

Tájékoztatófüzet

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA. CSAK EXPORTÁLÁSI CÉLOKRA.

Cikkszám: 20005715

Rendeltetés

A(z) NextSeq 550Dx készülék DNS-könyvtárak szekvenálására szolgál *in vitro* diagnosztikai vizsgálat során. A (z) NextSeq 550Dx készülék meghatározott regisztrált, tanúsított vagy jóváhagyott *in vitro* diagnosztikai reagensekkel és elemzési szoftverrel használható.

Az eljárás működési elve

A(z) Illumina NextSeq 550Dx készülék DNS-könyvtárak szekvenálására szolgál *in vitro* diagnosztikai vizsgálat során, és a klinikai laboratóriumban alkalmazott *in vitro* diagnosztikai eljárások elvégzésére kiképzett, képezített laboratóriumi személyzet által használható. A(z) NextSeq 550Dx 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 készülék a másodlagos elemzés során elvégzi a bázisazonosítások feldolgozását. A(z) NextSeq 550Dx a másodlagos elemzéshez különböző modulokat alkalmaz a munkafolyamattól függően. A Csírvonal és a Szomatikus variánsazonosító modul 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 variánsokról tartalmaznak adatokat.

Két rendszerből álló konfiguráció

A(z) NextSeq 550Dx két külön indítható rendszerből áll, ezért használható diagnosztikai (Dx) és csak kutatásra szolgáló (RUO) módban is. Az *in vitro* diagnosztikai szekvenálási vizsgálatok, többek között a Csírvonal és a Szomatikus variánsazonosító modul diagnosztikai módban használhatók. Csak IVD szekvenálási reagensek használhatók diagnosztikai módban. A NextSeq 550Dx teljesítményjellemzőinek és az eljárás korlátainak a meghatározása a Csírvonal és a Szomatikus variánsazonosító modul használatával, diagnosztikai módban történt.

Az eljárás korlátai

1. *In vitro* diagnosztikai használatra.
2. A Csírvonal és a Szomatikus variáns modul és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) vagy a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlet által nyújtott eredmények jellemzői:
 - Szekvenálási kimeneti teljesítmény ≥ 90 gigabázis (Gb)
 - 2 x 150 bázispár (bp) leolvasási hossz (párosított végű futtatás esetén)
 - 2 x 150 bp leolvasási hosszánál a Q30 kritériumnak megfelelő bázisok aránya $\geq 75\%$
A bázisok legalább 75%-ának Phred-skála szerinti minőségi pontszáma 30 feletti, ami 99,9%-nál nagyobb bázisazonosítási pontosságot jelez.
3. A vizsgálati szoftver nem illeszti a > 25 bp hosszúságú indeleket (inzerciók, deléciók és ezek kombinációi) tartalmazó leolvasásokat. Ezért a vizsgálati szoftver nem képes azonosítani a > 25 bp hosszúságú indeleket.
4. Előfordulhat, hogy a vizsgálati szoftver nem illeszti a szélsőséges tartalmú variánsokat tartalmazó ampikonkiolvasásokat, és ezért a területet vad típusúként jelenti. Ilyen szélsőséges tartalomnak minősülnek a következők:
 - Több mint három indelt tartalmazó kiolvasások
 - Legalább 30 bp hosszúságú, a teljes ampikon (a próbaterületek kivételével) méretének $> 4\%$ -át kitevő egynukleotid-variánsokat (SNP) tartalmazó leolvasások
 - A < 30 bp hosszúságú, a teljes ampikon méretének (a próbaterületekkel együtt) $> 10\%$ -át kitevő SNV-t tartalmazó leolvasások
5. A nagy variánsok, beleértve a több nukleotidból álló variánsokat (MNV-k) és a nagy indelek, a kimeneti VCF-fájlban különálló kisebb variánsokként szerepelhetnek.
6. A deléciós variánsok kiszűrésre vagy kihagyásra kerülhetnek, ha több két, egymás melletti ampikonra terjednek ki, ha a deléció legalább olyan hosszú, mint a két ampikon közötti átfedés.
7. A rendszer nem tudja kimutatni a közvetlenül egy primer mellett elhelyezkedő indeleket, ha nincs átfedő ampikon. Az átfedő ampikonokat tartalmazó területeken a vizsgálat nem tudja kimutatni a deléciókat, ha az átfedési terület kisebb a kimutatandó deléció méreténél. Ha például két egymás melletti ampikon közötti átfedés két bázispár, a vizsgálat nem tudja kimutatni azokat a deléciókat, amelyek mindkét bázist tartalmazzák. A két bázis közül az egyik deléciója kimutatható.
8. Mint minden hibridizációs alapú könyvtár-előkészítési munkafolyamat esetén, az oligonukleotid-kötő területeket érintő polimorfizmusok, mutációk, inzerciók és deléciók befolyásolhatják a vizsgált allélokat és a szekvenálással kapott azonosításokat. Például:
 - Lehetséges, hogy a primer területén lévő, egy fázisban lévő variáns nem amplifikálódik, álnegatív eredményt okozva.

- A primer területén elhelyezkedő variánsok megakadályozhatják a referenciaallél amplifikációját, ami helytelen homozigóta variáns azonosítását okozza.
 - A primer területén lévő indel variánsok a primer melletti kiolvasás álpozitív azonosítását okozhatják.
9. Előfordulhat az indelek kiszűrése, ha egy kiolvasás végéhez közel lépnek fel, és az illesztés során puha levágásra kerülnek.
10. A kis méretű MNV-k kimutatását nem hitelesítették, és ezek csak a szomatikus variáns modul jelentésében szerepelnek.
11. A VCF-ben 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.
12. Csak a csírvonal munkafolyamatra vonatkozó korlátozások:
- A(z) NextSeq 550Dx készülék berendezéshez készült Local Run Manager Csírvonal variánsazonosító modult alkalmazó NextSeq 550Dx berendezés a csírvonalbeli variánsok azonosítása kvalitatív eredményének a meghatározására szolgál (pl. homozigóta, heterozigóta, vad típus).
 - A Germline variánsazonosító modullal használva a pontos variánsazonosításhoz szükséges minimális ampikononkénti előfordulás 150x. Tehát legalább 150, ezt alátámasztó DNS-fragmentum szükséges, ami 300 egymást átfedő páros végű kiolvasással egyenértékű. A minták mérete és az összes vizsgált bázis száma befolyásolja ezt a másolatszámot. A GC-tartalom és más genomikus tartalmak befolyásolhatják a másolatszámot.
 - A másolatszám befolyásolhatja, hogy egy variáns homozigótaként vagy heterozigótaként kerül azonosításra.
 - Bizonyos, ismétlődő tartalmú környezetben található variánsok kiszűrésre kerülnek a VCF fájljából. Az RMxN ismétlési szűrő a variánsok kiszűrésére szolgál olyan esetekben, amikor a variáns szekvencia vagy annak egy része ismételten jelen van a variáns helyzete melletti referenciagenomban. A csírvonalbeli variánsok azonosítása esetén a referenciagenomban legalább kilenc ismétlődés szükséges a variáns kiszűréséhez. Ez csak a legfeljebb 5 bp hosszúságú ismétlésekre vonatkozik (R5x9).
 - Ha egy indel és egy SNV egyazon helyen van, lehetséges, hogy a rendszer csak az egyik variánst jelenti.
13. Csak a szomatikus munkafolyamatra vonatkozó korlátozások.
- A(z) NextSeq 550Dx készülék berendezéshez készült NextSeq 550Dx Local Run Manager Szomatikus variánsazonosító modult használó berendezés a szomatikus variánsok azonosítása kvalitatív eredményének a meghatározására szolgál (például legalább 0,026 variánsgyakoriságú szomatikus variánsok jelenléte esetén, 0,05 detektálási határérték mellett).
 - A Szomatikus variánsazonosító modullal használva a pontos variánsazonosításhoz szükséges minimális ampikononkénti előfordulás oligonukleotid poolonként 450x. Ennek eredményeképp 450 ezt alátámasztó DNS-fragmentum szükséges oligonukleotid készletenként, amely 900 egymást átfedő páros végű kiolvasással egyenértékű. A minták mérete és az összes vizsgált bázis száma befolyásolja ezt a másolatszámot. A GC-tartalom és más genomikus tartalmak befolyásolhatják a másolatszámot.

- A szomatikus variánsok azonosítása esetén a referenciagenomban legalább hat ismétlődés szükséges a variáns kiszűréséhez, és csak legfeljebb 3 bp hosszúságú ismétlésekre vonatkozik (R3x6).
- A szomatikus variáns modul nem alkalmas a csírvonalbeli és a szomatikus variánsok elkülönítésére. A modul a gyakoriságok nagy tartományában előforduló variánsok kimutatására szolgál, azonban a variáns gyakorisága 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.

A termék összetevői

A(z) Illumina NextSeq 550Dx a következőkből áll:

1. NextSeq 550Dx készülék (Cikkszám: 20005715)
2. A(z) NextSeq 550Dx készülék készülékhez való szoftverkomponensek, beleértve a következőket:

Szoftveralkalmazás	Beosztás	Leírás
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	A készülék működésének vezérlése	Az NOS szoftveralkalmazás irányítja a készülék működését a szekvenálás során, és képeket készít a Real-Time Analysis (RTA) szoftver számára.
Real-Time Analysis (RTA) szoftver	Az elsődleges elemzés elvégzése	Az RTA szoftveralkalmazás az NOS által minden szekvenálási futtatási ciklusban minden csempéről készült képet bázisazonosítási fájlkká alakít, amelyek a Local Run Manager elemzési moduljainak bemenetei. Az RTA szoftveralkalmazásnak nincs felhasználói felülete.
Local Run Manager	Interfész a modul kiválasztásához	A Local Run Manager szoftver a készülék beépített funkciója, amely a felhasználók kezelését, a megfelelő elemzési modul kiválasztását és az állapot nyomon követését végzi.
Szomatikus variáns modul	A másodlagos elemzés elvégzése	Ez a Local Run Manager szoftverhez tartozó elemzési modul a bázisazonosítási adatok másodlagos elemzését végzi. A feldolgozás részét képezi jellemzően a demultiplikálás, a FASTQ-fájlok létrehozása, az illesztés, a variánsok azonosítása és a variánsazonosítási formátumú (VCF) fájlok létrehozása. A variánsazonosító (Pisces) VCF-fájlokat hoz létre; ezek a referenciagenom meghatározott helyein található variánsokról tartalmazznak adatokat, többek között a variáns mért gyakoriságáról.

Szoftveralkalmazás	Beosztás	Leírás
Csíravonal variáns modul	A másodlagos elemzés elvégzése	Ez a Local Run Manager szoftverhez tartozó elemzési modul a bázisazonosítási adatok másodlagos elemzését végzi. A feldolgozás részét képezi jellemzően a demultiplikálás, a FASTQ-fájlok létrehozása, az illesztés, a variánsok azonosítása és a variánsazonosítási formátumú (VCF) fájlok létrehozása. A variánsazonosító (Pisces) VCF-fájlokat hoz létre; ezek a referenciagenom meghatározott helyein található variánsokról tartalmaznak adatokat, és minden variánst heterozigótaként vagy homozigótaként azonosítanak.

3. **Opcionális** Illumina DRAGEN szerver a NextSeq 550Dx készülékhez (Cikkszám: 20086130), beleértve a következő szoftverösszetevőt:

Szoftveralkalmazás	Beosztás	Leírás
Illumina Run Manager	Interfész az alkalmazásmódul kiválasztásához	Az Illumina Run Manager szoftver az opcionális, készüléken kívüli DRAGEN szerverre van telepítve. Az Illumina Run Manager lehetővé teszi a felhasználók kezelését, az elemzési modul kiválasztását, valamint a szekvenálási futtatás és az elemzés állapotának monitorozását.

Az opcionális Illumina DRAGEN szerverrel rendelkező NextSeq 550Dx készülék csak bizonyos országokban érhető el. Az Ön területén való elérhetőséggel kapcsolatban forduljon az Illumina képviselőjéhez.

Működési feltételek

A működési feltételekkel kapcsolatos további információkért lásd a *NextSeq 550Dx készülék helyszíni előkészítési útmutató* (dokumentum száma: 1000000009869) Környezeti feltételek című szakaszát.

Paraméter	Műszaki adatok
Hőmérséklet	19 °C és 25 °C (22 °C \pm 3 °C) közötti hőmérsékletet tartson fenn a laborban. Ez a hőmérséklet a készülék üzemi hőmérsékletét jelenti. Biztosítsa, hogy a futtatások során a környezeti hőmérséklet ne változhasson \pm 2 °C-nál nagyobb mértékben.
Páratartalom	Biztosítsa, hogy a labor relatív páratartalma 20 és 80% közt maradjon (nem kondenzálódó).

Eszközök és anyagok

Szükséges, de külön értékesített eszközök és anyagok

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles), cikkszám: 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), cikkszám: 20028871

Szükséges, de nem szállított eszközök és anyagok

A szekvenálási futtatáshoz használt, a felhasználó által beszerzett fogyóeszközök

Fogyóeszköz	Beszállító	Cél
70%-os izopropil-alkohollal átitatott törülkövendők vagy 70%-os etanol	VWR, katalógusszám: 95041-714 (vagy ezzel egyenértékű) Általános laboratóriumi beszállító	Az áramlási cella tisztítása és egyéb általános feladatok
Szöszmentes laboratóriumi törülköendő	VWR, katalógusszám: 21905-026 (vagy ezzel egyenértékű)	Az áramlási cella tisztítása és egyéb általános feladatok

A készülék karbantartásához használt, a felhasználó által beszerzett fogyóeszközök

Fogyóeszköz	Beszállító	Cél
5%-os NaOCl (nátrium-hipoklorit)	Sigma-Aldrich, cikkszám: 239305 (vagy ezzel egyenértékű, laboratóriumi minőségű)	A készülék mosása a futtatás utáni kézi mosással; 0,12%-ra hígítva
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalógusszám: P7949	A készülék mosása a kézi mosási módszerekkel; 0,05%-ra hígítva
Laboratóriumi minőségű víz	Általános laboratóriumi beszállító	A készülék mosása (kézi mosás)
Levegőszűrő	Illumina, cikkszám: 20063988	A készülék által hűtés céljából beszívott levegő tisztítása

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

Figyelmeztetések és óvintézkedések



FIGYELEM!

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

1. **A(z) Illumina által a(z) NextSeq 550Dx készülék készülékkel való használatra biztosított reagensek egyes összetevői potenciálisan veszélyes vegyi anyagokat tartalmaznak. Belélegzésük, lenyelésük, bőrrel 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.
2. A termékkel kapcsolatos súlyos eseményeket haladéktalanul jelentse az Illumina vállalatnak és a felhasználó és a páciens lakhelye szerinti tagállamok illetékes hatóságainak.
3. Minden vérmintát úgy kell kezelni, mintha ismert fertőző lenne humán immundeficiencia vírus (HIV), hepatitis B vírus (HBV) vagy más vérrel terjedő kórokozók tekintetében (általános óvintézkedések).
4. Az eljárások leírtaktól eltérő módon történő végrehajtása hibás eredményeket eredményezhet, vagy jelentősen csökkentheti a minta minőségét.
5. Használja a rutinszerű laboratóriumi óvintézkedéseket. Ne pipetázzon 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 készlet reagensei kezelése után alaposan mosson kezet.
6. 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.

7. A szennyeződés elkerülése érdekében ügyeljen arra, hogy az amplifikáció előtti és az az utáni területeken külön berendezések és fogyóeszközök legyenek (például pipetták, pipettahegyek, fűtőblokkok, vortexelőők és centrifugák).
8. Az index–minta párosításnak pontosan meg kell felelnie a kinyomtatott lemezelrendezésnek. A Local Run Manager automatikusan hozzárendeli az indexprimereket a mintanevekhez, ha azokat megadják a modulban. Javasoljuk a felhasználónak, hogy ellenőrizze a mintákkal társított indexprimereket a szekvenálási futtatás indítása előtt. A mintalap és a lemez elrendezése közötti eltérések esetén a pozitív minták azonosításának elmaradása és helytelen eredmények jelentése történik.
9. A számítógép vírusok elleni védelme érdekében határozottan ajánlott a felhasználó által biztosított vírusirtó szoftver telepítése. A telepítési utasításokat lásd a használati útmutatóban.
10. A(z) NextSeq 550Dx készüléket csak a panelek megbontása nélkül szabad működtetni. A készülék eltávolított panelek melletti működtetése hálózati feszültségnek és egyenfeszültségnek való potenciális kitéettséget jelent.
11. Ne érintse meg az áramlási cella emelvényét, amely az áramlási cella rekeszében található. Az itt található fűtő hőmérséklete 22 °C és 95 °C között változik, és égési sérülést okozhat.
12. A készülék tömege körülbelül 84 kg (185 font), és leejtés vagy nem rendeltetésszerű kezelés esetén súlyos sérülést okozhat.

Használati útmutató

A NextSeq 550Dx készülék következő használati utasításaihoz a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) vagy NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles) által biztosított reagensek szükségesek.

Futtatás létrehozása

Szekvenálási futtatás létrehozása Local Run Manager vagy Illumina Run Manager használatával. A(z) Local Run Manager használatával kapcsolatos utasítások az alábbiakban és itt találhatóak: NextSeq 550Dx készülék ismertető kézikönyve (dokumentumszám: 1000000009513). A futtatás Illumina Run Manager segítségével történő létrehozásához lásd: Illumina Run Manager a NextSeq 550Dx készülékhez szoftver útmutató (dokumentumszám: 200025239).

A(z) Local Run Manager vagy a(z) Illumina Run Manager közötti választással kapcsolatos utasításokért lásd: Illumina Run Manager a NextSeq 550Dx készülékhez szoftver útmutató (dokumentumszám: 200025239). Az egyes alkalmazásokra vonatkozó részletes utasításokat lásd az adott vizsgálat moduljában vagy alkalmazási útmutatójában.

A következő utasítások a(z) Local Run Manager csíravonal és szomatikus variáns modulok használatára vonatkoznak.

Paraméterek beállítása

1. Jelentkezzen be a Local Run Managerbe.
2. Válassza a **Create Run** (Futtatás létrehozása) lehetőséget, majd válassza a **Somatic Variant** (Szomatikus variáns) vagy a **Germline Variant** (Csírvonal variáns) lehetőséget.
3. Írja be a futtatás nevét, amely azonosítja a futtatást a szekvenálástól az elemzésig. Ehhez használjon alfanumerikus karaktereket, szóközöket, aláhúzásokat vagy kötőjeleket.
4. [Opcionális] Adja meg a futtatás leírását a futtatás azonosításához. Ehhez használjon alfanumerikus karaktereket, szóközöket, aláhúzásokat vagy kötőjeleket.
5. Válassza ki a minták számát és az indexkészletet a legördülő listából. A kiválasztás során vegye figyelembe a következő információkat.
 - A legördülő lista egy indexkészlettel rendelkező minták számát tartalmazza. A 24-Set 1 például 24 vizsgálendő mintát jelöl, az 1. indexkészlet indexeivel.
 - Az indexkészlet számok az i5 és i7 indexpárok különböző készleteire vonatkoznak. Az 1. és a 2. készlet egyaránt indexdiverzitást biztosít. Két indexkészlet áll rendelkezésre egy készlet depléciójának elkerüléséhez.
 - Válassza ki a vizsgálendő minták számához legközelebb eső minták számát. Ha a minták pontos száma nincs a listában, válassza ki a legközelebbi számot, de az kevesebb legyen, mint a vizsgált szám. Ha például 18 mintát szeretne vizsgálni, válasszon ki 16 mintát.
 - Az indexdiverzitási követelményeknek megfelelő javasolt mintaüregek és indexkombinációk zöld színnel vannak kiemelve.

Jegyzékfájlok importálása a futtatáshoz

1. Győződjön meg arról, hogy az importálni kívánt jegyzékek elérhető hálózati helyen vagy USB-meghajtón találhatóak.
2. Válassza az **Import Manifests** (Jegyzékek importálása) lehetőséget.
3. Navigáljon a jegyzékfájltra, és válassza ki a hozzáadni kívánt jegyzéket.

MEGJEGYZÉS Ahhoz, hogy a csírvonal variáns vagy a szomatikus variáns elemzési modult használó összes futtatáshoz elérhetővé tegye a jegyzékfájlokat, adja hozzá a jegyzékeket a Module Settings (Modulbeállítások) funkcióval. Ehhez a művelethez rendszergazdai szintű jogosultság szükséges. További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék ismertető kézikönyve (dokumentumszám: 1000000009513)*.


Minták megadása a futtatáshoz

Adja meg a futtatásban szereplő mintákat az alábbi két lehetőség egyikével és az utána következő utasítások szerint.

Enter samples manually (Minták manuális bevitele) – A Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn található üres táblázat használatával.


Import samples (Minták importálása) – Egy külső, vesszővel elválasztott értékek (*.csv) formátumú fájl megkeresésével. Egy sablon letölthető a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn.

Minták manuális bevitele

1. Adjon meg egy egyedi mintanevet (*szomatikus variánselemző modul*) vagy mintaazonosítót (*csírvonal-variánselemző modul*).
Ehhez használjon alfanumerikus karaktereket, kötőjeleket vagy aláhúzásokat.
2. [Választható] Pozitív vagy negatív kontrollminták esetén kattintson a jobb gombbal, és válassza ki a kontroll típusát.
Az egyik mintaüregben lévő kontroll neve automatikusan feltölti az ugyanazt a kontrollt tartalmazó üreget a másik keverékben.
3. [Opcionális] Adja meg a minta leírását a Sample Description (Minta leírása) mezőben.
Ehhez használjon alfanumerikus karaktereket, kötőjeleket vagy aláhúzásokat.
4. Válasszon ki egy Index 1 adaptert az Index 1 (i7) legördülő listából.
Ha a javasolt mintaüregeket használja, a szoftver automatikusan feltölti az indexek diverzitási követelményeinek megfelelő i7 és i5 indexadaptereket. Ha a vizsgálandó minták pontos száma nem szerepel a listában, ne felejtse el a további mintaüregekhez indexadaptert választani.
5. Válasszon ki egy Index 2 adaptert az Index 2 (i5) legördülő listából.
6. Válasszon ki egy jegyzékfájlt a Manifest (Jegyzék) legördülő listából.
Az „A” keverékbe tartozó mintákhoz más jegyzékre van szükség, mint a „B” keverékbe tartozó mintákhoz.
7. Az alábbi lehetőségeket használhatja a lemezelrendezés megtekintéséhez, kinyomtatásához vagy a könyvtár-előkészítéshez való referenciaként történő mentéséhez:
 - Válassza a  **Print** (Nyomtatás) ikont a lemezelrendezés megjelenítéséhez. Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a lemezelrendezés kinyomtatásához.
 - Válassza az **Export** (Exportálás) lehetőséget a mintainformációk külső fájlba történő exportálásához.
8. Válassza ki a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.

Minták importálása

1. Válassza az **Import Samples** (Minták importálása) lehetőséget, és tallózzon a mintainformációs fájl helyére. Két típusú fájlt importálhat.
 - Új lemezelrendezés létrehozásához válassza a **Template** (Sablon) lehetőséget a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn. A sablonfájl tartalmazza a megfelelő oszlopcímeket az importáláshoz. Adja hozzá a mintainformációkat a futtatásban szereplő minták egyes oszlopaihoz. Törölje a fel nem használt cellákban lévő példaadatokat, majd mentse el a fájlt.

- Használjon egy mintaadatokat tartalmazó fájlt, amelyet a csírvonal variáns vagy szomatikus variáns modulból exportáltak az Export (Exportálás) funkcióval.
2. Válassza a  **Print** (Nyomtatás) ikont a lemezelrendezés megjelenítéséhez.
 3. Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a könyvtárak elkészítéséhez referenciaként használandó lemezelrendezés kinyomtatásához.
 4. Válassza ki a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.

A reagenskazetta előkészítése

A sikeres szekvenáláshoz ügyeljen a reagenskazettára vonatkozó utasítások gondos betartására.

1. Vegye ki a reagenskazettát a -25 °C és -15 °C közötti tárolóból.
2. Olvassa fel a reagenseket a következő módszerek egyikével. Ne merítse a reagenskazettát folyadék alá. A kazetta felolvasztása után szárítsa meg, mielőtt folytatná a következő lépéssel.

Hőmérséklet	Felolvadási idő	Stabilitási idő
15 és 30 °C közötti vízfürdő	60 perc	Legfeljebb 6 óra
2 °C és 8 °C között	7 óra	Legfeljebb 5 nap

MEGJEGYZÉS Ha egy vízfürdőben több mint egy kazetta olvad fel, hosszabb olvadási idő szükséges.

3. Fordítsa át ötször a kazettát, hogy a reagensek összekeveredjenek.
4. Tekintse meg a kazetta alját, hogy a reagensek felolvadtak-e, és nem tartalmaznak-e csapadékot. Ellenőrizze a 29-es, 30-as, 31-es és 32-es pozíciókban lévő reagensek felolvadását, mert ezek a legnagyobbak, és ezek olvadnak fel a leglassabban.
5. Óvatosan ütögesse az asztalhoz, hogy csökkentse a légbuborékok előfordulását.
A legjobb eredmények érdekében közvetlenül folytassa a minta betöltésével és a futtatás előkészítésével.

Az áramlási cella előkészítése

1. Vegyen ki egy új doboz áramlási cellát a 2–8 °C-os tárolóból.
2. Távolítsa el a doboz fóliacsomagolását, és tegye félre szobahőmérsékleten 30 percre.

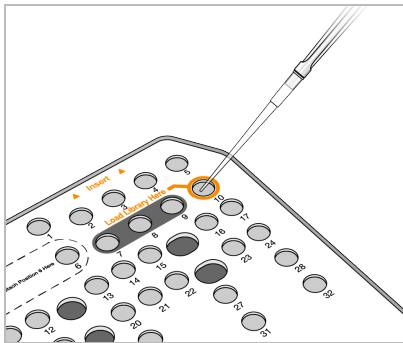
A könyvtárak előkészítése a szekvenáláshoz

Denaturálja a könyvtárakat, és hígítsa 1,3 ml betöltési térfogatra. A gyakorlatban a betöltési koncentráció változó lehet a könyvtárak előkészítésétől és a mennyiségi meghatározási módszerektől függően. A mintakönyvtárak hígítása az oligonukleotid-keverékek összetettségétől függ. A mintakönyvtárak szekvenálásra való előkészítésére vonatkozó utasításokat, beleértve a könyvtárak hígítását és összekeverését, lásd a megfelelő könyvtár-előkészítési készletre vonatkozó Használati útmutató fejezetet. A(z) NextSeq 550Dx esetén szükséges a klasztersűrűség optimalizálása.

Könyvtárak betöltése a reagenskazettába

1. Szőszmentes törölkendővel tisztítsa meg a 10-es számú, **Load Library Here** (Ide töltse be a könyvtárat) feliratú tároló zárófoliáját.
2. Szűrje át a zárófoliát egy tiszta 1 ml-es pipettaheggyel.
3. Töltsön 1,3 ml előkészített könyvtárat a 10-es számú, **Load Library Here** (Ide töltse be a könyvtárat) feliratú tárolóba. A könyvtárak adagolásakor kerülje el a zárófolia megérintését.

1 ábra A könyvtárak betöltése



Szekvenálási futtatás beállítása

A futtatás beállítására vonatkozó részletes utasításokat lásd: NextSeq 550Dx készülék ismertető kézikönyve (dokumentumszám: 1000000009513).

1. Jelentkezzen be a NextSeq 550Dx készülékbe a Local Run Manager vagy az Illumina Run Manager szoftverhez való jelszavával.
2. Az NOS szoftver Home (Kezdőképernyő) képernyőjén válassza a **Sequence** (Szekvenálás) lehetőséget.
3. Válassza ki a futtatást a listából, majd válassza a **Next** (Tovább) gombot.
Sorban megnyílnak a következő futtatásbeállítási képernyők: Load Flow Cell (Áramlási cella behelyezése), Load Buffer Cartridge (Pufferkazetta behelyezése), Load Reagent cartridge (Reagenskazetta behelyezése) és Pre-Run check (Futtatás előtti ellenőrzés).

MEGJEGYZÉS A futtatások csak a futtatás tervezésekor használt Run Manager szoftverrel érhetők el. A Run Manager szoftver beállításával kapcsolatban lásd: Illumina Run Manager a NextSeq 550Dx készülékhez szoftver útmutató (dokumentumszám: 200025239).

4. Ha a Load Flow Cell (Áramlási cella behelyezése) képernyő megjelenik, tisztítsa meg és helyezze be az áramlási cellát.
 - Vegye ki az áramlási cellát a fóliacsomagolásból.
 - Nyissa ki az átlátszó műanyag kagylótok csomagolást, és vegye ki az áramlási cellát

- Szőszmentes alkoholos törlőkendővel tisztítsa meg az áramlási cella üvegfelületét. Törölje szárazra az üvegfelületet szőszmentes laboratóriumi törlőkendővel
 - Győződjön meg arról, hogy az áramlási cella üvegfelülete tiszta. Szükség esetén ismételje meg a tisztítási lépést.
 - Távolítsa el az előző futtatáshoz használt áramlási cellát.
 - Illessze az áramlási cellát az illesztőtűskékhez, és helyezze az emelvényre.
5. Válassza a **Load** (Betöltés) lehetőséget.
Az ajtó automatikusan bezáródik, az áramlási cella azonosítója megjelenik a képernyőn, és a rendszer ellenőrzi az érzékelőket.
6. Kövesse a szoftver utasításait a használt reagensek tárolójának kiürítéséhez, a NextSeq 550Dx pufferkazetta behelyezéséhez és a NextSeq 550Dx reagenskazetta behelyezéséhez.
A NextSeq 550Dx pufferkazetta és reagenskazetta behelyezésekor a szoftver leolvassa és rögzíti az RFID-t. A pufferkazetta és a reagenskazetta azonosítója megjelenik a képernyőn, és megtörténik az érzékelők ellenőrzése.
7. Ha az automatikus futtatás előtti ellenőrzés befejeződött, válassza a **Start** (Indítás) lehetőséget. (Nem szükséges, ha automatikus elindításra van beállítva).
8. A futás megkezdésekor megnyílik a Sequencing (Szekvenálás) képernyő. Ez a képernyő vizuálisan megjeleníti a folyamatban lévő futtatást, beleértve az intenzitásokat és a minőségi pontszámokat (Q-pontszámok).

Eredmények

A rendszer részét képező Real-Time Analysis (RTA) szoftver képelemzést és bázisazonosítást végez, és minőségi pontszámot rendel minden bázishoz minden szekvenálási ciklusban. Amikor az elsődleges elemzés befejeződött, a modul automatikusan elkezd a másodlagos elemzést. Itt a(z) Local Run Manager csírvonal és a szomatikus variáns modul által végzett másodlagos elemzés folyamatait ismertetjük a(z) NextSeq 550Dx készülék készüléken.

Demultiplikálás

A demultiplikálás összehasonlítja az egyes index-kiolvasási szekvenciákat a futtatáshoz megadott indexszekvenciákkal. Ebben a lépésben nem történik minőségi értékek figyelembevétele.

Az indexleolvasások azonosítása a következő lépésekben történik:

- A rendszer számozza a mintákat 1-től kezdődően, a futtatáshoz való felsorolás sorrendjében.
- A 0-s mintaszám a mintához nem rendelt klaszterek számára van fenntartva.
- A klaszterek akkor kerülnek hozzárendelésre egy mintához, ha az indexszekvencia pontosan megegyezik, vagy ha indexleolvasásonként legfeljebb egy eltérés van.

FASTQ-fájlok létrehozása

A demultiplikálás után a szoftver FASTQ formátumú közbenső elemzési fájlokat hoz létre. Ez a formátum a szekvenciák megadására használt szöveges formátum. A FASTQ-fájlok tartalmazzák az egyes minták leolvasásait és a hozzájuk tartozó minőségi pontszámokat. A szűrőn át nem ment klasztereket a rendszer kizárja.

Minden FASTQ-fájl csak egy minta leolvasásait tartalmazza, és a minta neve szerepel a FASTQ-fájl nevében. A csírvonal és a szomatikus variáns modulban oligonukleotid-keverékeként és mintákként nyolc FASTQ-fájl készül, négy az 1-es és négy a 2-es leolvasásból. Ez a kimenet mintákként összesen 8, illetve 16 FASTQ-fájlt eredményez a csírvonal, illetve a szomatikus esetében. A FASTQ-fájlok tartalmazzák az illeszkedéshez használt elsődleges bemenő adatokat.

Illesztés

Az illesztési lépés során a sávos Smith–Waterman-algoritmus az egyes mintákból származó klasztereket a jegyzékfájlban megadott amplikonsekvenciákhoz igazítja.

A sávos Smith–Waterman-algoritmus szemiglobális szekvenciaillesztést végez, hogy meghatározza a hasonló régiókat két szekvencia között. A teljes szekvencia összehasonlítása helyett a Smith–Waterman-algoritmus az összes lehetséges hosszúságú szegmenst összehasonlítja.

Minden egyes párosított végű leolvasást az adott leolvasáshoz tartozó szondaszekvenciákhoz való igazodás szempontjából értékeli.

- Az 1. leolvasást a locustól lefelé elhelyezkedő szekvenciára specifikus oligonukleotidok (Downstream Locus-Specific Oligos, DLSO) fordított kiegészítőjével (az ellentétes szál tartalmával) összehasonlítva értékeli.
- A 2. leolvasást a locustól felfelé elhelyezkedő szekvenciára specifikus oligonukleotidokkal (Upstream Locus-Specific Oligos, ULSO) összehasonlítva értékeli.
- Ha a leolvasás kezdete legfeljebb egy eltéréssel különbözik egy szondaszekvenciától, akkor a leolvasás teljes hosszát illeszti az adott szekvencia amplikoncéljához.
- Ha a leolvasás kezdete legfeljebb három eltéréssel (mismatch eltérések vagy vezető indelek miatti eltolódások) különbözik egy szondaszekvenciától, akkor a leolvasás teljes hosszát illeszti az adott szekvencia amplikoncéljához.
- A DLSO-n és ULSO-n belüli indelek nem figyelhetők meg a vizsgálat kémiai jellemzői miatt.

Az illeszkedések szűrése az illesztési eredményekből történik a hibás illeszkedések aránya alapján, az amplikon hosszától függően vagy a vizsgált területre, vagy a teljes amplikonra vonatkozóan. A kiszűrt illeszkedések az illesztési fájlokban nem illesztettként szerepelnek, és nem kerülnek felhasználásra a variánsazonosításhoz.

Variánsazonosítás

A Pisces variánsazonosító arra készült, hogy a készülékhez előkészített könyvtárakból SNV és indel variánsokat azonosítson.

Jelentések és további kimeneti fájlok

A variánselemző modulok PDF és tabulátorral elválasztott szöveg (*.txt) formátumú jelentéseket készítenek, amelyek a mérőszámokat mutatják, például a szekvenálási mélységet és a variánsok számát. A modulok kimenetként például VCF és genom-variánsazonosítási formátumú (gVCF) fájlokat is előállítanak a variánsazonosító alkalmazások számára.

Minőség-ellenőrzési eljárások

A(z) NextSeq 550Dx szoftver minden egyes futtatást, mintát és bázisazonosítást értékel a minőség-ellenőrzési mérőszámok alapján. Ajánlott a könyvtár-előkészítés során a pozitív és negatív kontrollok használata és ezek eredményének értékelése. A kontrollok értékelése:

- **Negatív kontroll (Nincs sablonkontroll) 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.

Teljesítményjellemzők

A(z) NextSeq 550Dx készülék teljesítményjellemzőinek meghatározása a csíravonal és a szomatikus variánsazonosító modullal, a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel történt, a megerősítésük pedig a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) használatával. Az elvégzett vizsgálatok többek között: mintaindexelés, mintaátvitel, bemeneti DNS mennyisége, analitikai szenzitivitás (vak-határérték és kimutatási határérték), pontosság, precizitás, módszerek összehasonlítása és reprodukálhatóság.

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel végzett analitikai vizsgálatok célja a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) esetében korábban megállapított teljesítményre vonatkozó nyilatkozatok értékelése volt. Az eredmények szerint a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx használatával a két készlet (v2 és v2.5) teljesítménye hasonló. A preanalitikai tényezőkkel, például az extrakciós módszerekkel vagy a zavaró anyagokkal kapcsolatos teljesítményjellemzőket lásd a *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx terméktájékoztatójában*.

A teljesítményjellemzők számításaiban használt definíciók

1. A pozitív százalékos egyezés (PPA) a referencia-módszerrel variánsként azonosított locusok közül a vizsgálat által helyesen azonosítottak aránya.
 - $(\text{a vizsgálat által helyesen azonosított variáns locusok száma}) / (\text{variáns locusok száma})$
A vizsgálattal és a referencia-módszerrel is helyesen azonosított variáns locusok a valódi pozitívak (TP).
A referenciaként vagy másféle variánsként azonosított, valójában variáns locusok az álnegatívak (FN).
2. A negatív százalékos egyezés (NPA) a referencia-módszerrel vad típusúként azonosított locusok közül a vizsgálat által helyesen azonosítottak aránya.
 - $(\text{a vizsgálat által helyesen azonosított vad típusú locusok száma}) / (\text{vad típusú locusok száma})$
A vizsgálattal és a referencia-módszerrel is helyesen azonosított vad típusú locusok a valódi negatívak (TN). A vizsgálat által variánsként azonosított, valójában vad típusú locusok az álpozitívak (FP).
3. A teljes százalékos egyezés (OPA) a vizsgálat által a referencia-módszernek megfelelően azonosítottak aránya.
 - $((\text{a vizsgálat által helyesen variánsként azonosított locusok száma}) + (\text{a vizsgálat által helyesen vad típusúként azonosított locusok száma})) / ((\text{variáns locusok teljes száma}) + (\text{vad típusú locusok teljes száma}))$
4. A PPA, NPA és OPA számításában nem szerepelnek a nem azonosított locusok (a bármelyik minőségi szűrőnek meg nem felelő variáns vagy referencialocusok).
5. Az autoszomális azonosítási arány a szűrőknek megfelelő locusok száma osztva a szekvenált pozíciók számával az 1–22. kromoszómán, az X- és az Y-kromoszóma kizárásával. Ebben a mérőszámban nincs figyelembe véve, hogy az azonosítások megegyeznek-e a referencia-módszer eredményével.

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Cycles) készlet teljesítménye

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(z) NextSeq 550Dx készülék használatával egyetlen szekvenálási futtatás során feldolgozható minták minimális (8) és maximális (96) számát. Nyolc egyedi Platinum Genome mintát vizsgáltak, mintánként 12 különböző indexprimer-kombinációval. A csírvonalbeli variáns modullal vizsgált minták eredményeit összehasonlították a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával.

Az első futtatási sorozatban 96 egyedi indexszel ellátott mintakönyvtárat vizsgáltak egy reprezentatív vizsgálatban, amelyben mind a 23 emberi kromoszómán elhelyezkedő különböző géneket, összesen szálanként 12 588 bázist lefedő területeket kérdeztek le, annak ellenőrzése érdekében, hogy a vizsgálattal

lehet-e következetesen genotipizálást végezni egy adott minta esetében különböző indexprimer-kombinációk esetén. A második futtatási sorozatban nyolc egyedi indexszel ellátott mintakönyvtárat szekvenáltak két szekvenálási futtatásban, hogy ellenőrizzék a támogatott indexek minimális számát.

A 96 indexszel végzett futtatások esetében a PPA az SNV-k esetében 98,7–100%, a PPA az inzerciók és deléciók esetében 100% és az NPA mind a 96 indexkombináció esetében 100% volt. A 8 indexszel végzett futtatások esetében a PPA 100% volt (az SNV-k, az inzerciók és a deléciók esetében is), és az NPA mind a nyolc indexkombináció esetében 100% volt.

Mintaátvitel

A NextSeq 550Dx készülékkel több minta és kontroll szekvenálható egy szekvenálási futtatás során. Vizsgálatot végeztek a szekvenálási futtatáson belüli és a szekvenálási futtatások közötti mintaátvitel mértékének értékelésére. Két Platinum Genome mintán, egy férfi és egy női mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist (150 amplikont) tartalmazó különböző gének leolvasásával. A könyvtárat a NextSeq 550Dx készüléken, a csírvonal variánsazonosító modulal szekvenálták. A férfi minták átvitelét a női mintákba az alapján mutatták ki, hogy az Y-kromoszóma amplikonjai jelen voltak a női mintákban.

Futtatáson belüli átvitel történhet a klasztergenerálás, az indexciklusban történő bázisazonosítás és a minta demultiplikálása során. A szekvenáláson belüli mintaátvitel vizsgálatához a NextSeq 550Dx készüléken egyszerre szekvenáltak egy férfi és egy női minta 46–46 ismétléséből és négy negatív sablonkontrollból álló könyvtárkészletet. A futtatáson belüli mintaátvitel értékeléséhez összehasonlították az Y-kromoszóma amplikonjainak előfordulását a női minták egyes ismétléseiben és az Y-kromoszóma amplikonjainak átlagos előfordulását a férfi minták összes ismétlődésében. A futtatáson belüli mintaátvitel medián értéke 0,084% volt.

A futtatások közötti mintaátvitel vizsgálatához két könyvtárkeveréket készítettek, és ezeket egymás után szekvenálták egy NextSeq 550Dx készüléken. Az első keverék egy női minta 46 ismétlését és két negatív sablonkontrollt tartalmazott. A második keverék egy férfi minta 46 ismétlését és két negatív sablonkontrollt 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 értékeléséhez összehasonlították az Y-kromoszóma amplikonjainak előfordulását a női mintakeverék második futtatása során mért ismétlésekben és a férfi mintakeverék ezeknek megfelelő ismétléseiben. A futtatások közötti mintaátvitel medián értéke 0,0076% volt.

Bemeneti DNS mennyisége

Vér (csírvonal)

A bemenő, vérből származó DNS mennyiségének tartományát a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel végzett könyvtár-előkészítéshez a(z) NextSeq 550Dx készülék használatával, csírvonal variánsazonosító modul munkafolyamattal állapították meg. Ezt a tartományt egy sorozatos hígítási vizsgálatban értékelték, amelyben 13 Platinum Genome mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist tartalmazó különböző gén leolvasásával. A könyvtárat két NextSeq 550Dx készüléken, egy tétel NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel szekvenálták.

Öt minta esetén ötféle bemeneti DNS-mennyiséget vizsgáltak 250 ng és 12 ng között (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng és 12 ng). Nyolc mintát vizsgáltak egyetlen ismétlésben mind az öt DNS-mennyiséggel. A pontosság meghatározásához a minták genotípusát a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával hasonlították össze. Az eredményeket meghatározták mindegyik bemeneti mennyiség esetében. Minden variánstípus (SNV, inzerció és deléció) PPA-értékét mutatja az [1 táblázat](#); az NPA-t a [2 táblázat](#) tartalmazza. Mindegyik bemeneti szint hasonló pontosságot mutatott. A TruSeq Custom Amplicon Kit Dx esetén a DNS ajánlott bemeneti mennyisége 50 ng, a teljesítményjellemzőknek való megfeleléshez az alsó és a felső határérték 25 ng és 100 ng.

1 táblázat Mindegyik bemeneti DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok szerint

Bemeneti DNS mennyisége (ng)	Variáns típusa	Várt variánsok száma	Valódi pozitív	Álnegatív	Variáns azonosításának hiánya	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Inzerció	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Deléció	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

2 táblázat NPA az egyes bemeneti DNS-mennyiségek esetén

Bemeneti DNS mennyisége (ng)	Valódi negatív	Álpozitív	Referencia, sikertelen azonosítások	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Szomatikus)

A bemenő, formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) DNS mennyiségének tartományát a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel végzett könyvtár-előkészítéshez a NextSeq 550Dx készülékkel, szomatikus variánsazonosító modul munkafolyamattal állapították meg. A DNS mennyiségének tartományát egy sorozatos hígítási vizsgálatban értékelték, amelyben három Platinum Genome mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist tartalmazó különböző gének leolvasásával. A GM12878 és GM12877 Platinum Genome sejtvonalat formalinnal fixálták és paraffinba ágyazták, majd DNS-extrakciót végeztek. A GM12878-at a GM12877-tel úgy hígították, hogy a 79 variáns (55 SNV, 9 inzerció és 15 deléció) allélfrekvenciája (VAF) körülbelül 0,025, 0,05, illetve 0,10 legyen. Ezenkívül minden minta tartalmazott 91 olyan variánst, amelyek VAF-értéke magasabb, akár 1,0 volt. A mintákat két példányban dolgozták fel öt bemeneti DNS-mennyiséggel, amelyeknek a TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit készlettel mért átlagos delta mennyiségi ciklus (dCq) értéke 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 és 7,8 volt. Mindegyik könyvtárat két NextSeq 550Dx készüléken, két tétel NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel szekvenálták. A pontosság meghatározásához a minták variánsazonosításait a Platinum Genomes 2016-1.0 verziójával hasonlították össze. Minden variánstípus (SNV, inzerció és deléció) PPA-értékét mutatja az [3 táblázat](#); az NPA-t a [4 táblázat](#) tartalmazza. A 0,05 VAF vagy annál magasabb VAF-értékű variánsok esetében az ajánlott dCq ≤ 4 , és a teljesítményjellemzők teljesítéséhez szükséges alsó határérték 4,6.

3 táblázat Mindegyik bemeneti DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok szerint

Átlagos dCq	Variáns típusa	Várt variánsok száma	Várt azonosítás hiánya	Hígítás VAF-célértéke					
				0,025		0,05		0,10	
				Variáns azonosításának hiánya	PPA (%)	Variáns azonosításának hiánya	PPA (%)	Variáns azonosításának hiánya	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nincs.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Inzerció	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Deléció	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

4 táblázat NPA az egyes bemeneti DNS-mennyiségek esetén

Átlagos dCq	Várt vad típus	Hígítás VAF-célértéke					
		0,025		0,05		0,10	
		Referencia, sikertelen azonosítások	NPA (%)	Referencia, sikertelen azonosítások	NPA (%)	Referencia, sikertelen azonosítások	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

Analitikai szenzitivitás (vak-határérték, LoB és kimutatási határérték, LoD)

Ezt a vizsgálatot a NextSeq 550Dx készüléken használt szomatikus variánsazonosító modul vak-határértékének (LoB) és kimutatási határértékének (LoD) értékelésére végezték. Ehhez reprezentatív vizsgálatot végeztek 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist tartalmazó különböző gének leolvasásával. A GM12878 és GM12877 Platinum Genome sejtvonalat formalinnal fixálták és paraffinba ágyzták, majd DNS-extrakciót végeztek. A GM12878-at a GM12877-tel úgy hígították, hogy a 74 variáns (53 SNV, 7 inzerció és 14 deléció) frekvenciája körülbelül $0,05 \pm 0,02$ legyen. A GM12877-et és a hígított GM12878-at (GM12878-D) hat egymást követő indítási napon vizsgálták egyetlen készüléken, felváltva két tétel NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel, összesen hat szekvenálási futtatás során. Ez a GM12878 mindegyik variánsa esetén 60 ismétlést és a GM12877 mindegyik ennek megfelelő vad típusú pozíciója esetében 72 ismétlést jelentett reagenstételenként. A LoB és LoD kiszámítása a CLSI EP17-A2-ben leírt klasszikus megközelítéssel, a nem paraméteres módszerrel történt. A LoB-t és a LoD-t az SNV-kre, az inzerciókra és a deléciókra külön-külön számították ki az egyes variánstípusok variánsgyakoriságainak összevonásával. Az I. típusú hibát 0,01-es gyakorisággként, a II. típusú hibát pedig 0,05-ös gyakorisággként határozták meg.

Az LoB számításához a variánsok összesített gyakoriságait sorba rendezték a legalacsonyabbtól a legmagasabbig, és kiszámították a 99. ranghoz tartozó pozíciót minden reagenstétel és minden variánstípus esetében (5 táblázat). A szomatikus variáns modul a variánsok minőségi kimutatásához határértékként 0,026-os variánsfrekvenciát (effektív LoB) használ. A kiszámított LoB-érték igazolta, hogy ez a határérték legfeljebb 0,01-es gyakorisággal eredményez I. típusú hibát.

5 táblázat Vak határérték

Variáns típusa	Összes megfigyelés	LoB – 1. reagenstétel	LoB – 2. reagenstétel
SNV	3816	0,77	0,77
Inzerció	504	0,56	0,56
Deléció	1008	1,20	1,20

Az LoD számításához meghatározták a 0,026 határérték alá eső minden egyes mutáció gyakoriságának százalékos értékét mindegyik reagenstétel és mindegyik variánstípus esetén (6 táblázat). Mivel a százalékos arányok alacsonyabbak voltak, mint a II. típusú hiba 5% (0,05) értéke, a kombinált variánsfrekvenciák mediánját számították ki LoD-ként (6 táblázat). Az egyes variánstípusok LoD-jét a két reagenstételre kapott két érték közül a nagyobbikként állapították meg: 4,97% az SNV-k esetében, 5,12% az inzerciók esetében és 5,26% a deléciók esetében.

6 táblázat Kimutatási határérték

Reagenstétel	Variáns típusa	Összes megfigyelés	VAF-mérések száma < 2,6%	VAF-mérések százaléka < 2,6%	Kimutatási határérték (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Inzerció	420	6	1,4	5,08
	Deléció	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Inzerció	420	5	1,2	5,12
	Deléció	840	7	0,80	5,26

Pontosság

Csíravonal

Az alábbi vizsgálatban a Csíravonal modul variánsazonosítási pontosságát mérték fel a(z) NextSeq 550Dx készülék készüléken, a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel. 13 Platinum Genome mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist (150 amplikont) tartalmazó különböző gének leolvasásával. Összesen kilenc futtatást végeztek három szekvenálókészülékkel, három reagenstétellel, három kezelővel és öt különböző indítási napon történő kezdéssel. Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a pontosan jellemzett referencia-módszerrel, a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával. A konfidens genomterületek meghatározása e referencia-módszerrel való összehasonlítással történt, ha nincs másképpen megadva.

7 táblázat A csíravonalbeli eredmények egyezésének összefoglalása

Kritérium	Összes megfigyelés ¹	Eredmény megfigyelés szerint ²	Eredmény futtatás szerint ³
Az SNV-k PPA-értéke	819	98,7	> 99,9
Az inzerciók PPA-értéke	819	95,0	98,9
A deléciók PPA-értéke	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Számítás: futtatásonkénti minták száma (91) x futtatások száma (9) = 819.

²A legalacsonyabb érték az egyes mintaismétlések mind a 9 futtatásból kapott adatainak összesített elemzésével.

³A legalacsonyabb érték az egyes futtatások adatainak összesített elemzésével.

A [8 táblázat](#) 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.

8 táblázat Csírvonalbeli eredmények egyezése minták szerint

Minta	Átlagos azonosítási arány	Várt variánsok ¹	Valódi pozitív	Álnegatív	Variáns azonosításának hiánya	Valódi negatív	Álpozitív	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ A variánsok teljes száma az összes mintaismétlésben a 9 futtatás során.

A [9 táblázat](#) 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.

9 táblázat Csírvonalbeli eredmények egyezése minták szerint, variánstípusok szerint

Minta	SNV-k			Inzerciók			Deléciók		
	Várt	Valódi pozitív	Álnegatív	Várt	Valódi pozitív	Álnegatív	Várt	Valódi pozitív	Álnegatív
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

A mintákat tovább elemezték a kis inzerciók és deléciók (indelek) azonosítása érdekében. A [10 táblázat](#) tartalmazza az általános összefoglalást. Összesen 71 olyan indelt találtak, amelyek mérete az inzerciók esetében 1–24 bp, illetve a deléciók esetében 1–25 bp volt.

10 táblázat A csírvonalbeli indelek kimutatásának összefoglalása

Variáns Típus	Várt variánsok száma	Valódi pozitív	Álnegatív	Variáns azonosításának hiánya	PPA
Inzerció	18522	18018	27	477	99,9
Deléció	17388	17073	0	315	100

A reprezentatív vizsgálat 150 amplikonból állt, amelyeket úgy terveztek, hogy lefedjenek többféle genomiális tartalmakat. Az amplikonok GC-tartalma 0,19–0,87 között volt. Az amplikonok tartalmaztak többféle, egy nukleotidot (például PolyA, PolyT), két nukleotidot és három nukleotidot tartalmazó ismétlődést is. Az adatokat amplikononként összesítették (11 táblázat), hogy meghatározzák a genom tartalmának hatását a helyes azonosítások százalékos arányára. A helyes azonosítások százalékos aránya a variáns- és referenciaazonosításokat is tartalmazza, és hibás vagy sikertelen azonosítás esetén kisebb mint 100%.

11 táblázat Csírvonalbeli amplikonszintű pontosság

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	NA	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly G (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	NA	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	NA	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	NA	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	NA	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly G (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	NA	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	NA	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	NA	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	NA	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly G (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	NA	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	NA	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	NA	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	NA	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
71	11	64418856	64418957	102	102	NA	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	NA	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	NA	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	NA	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	NA	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	NA	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	NA	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly G (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	NA	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
123	18	59773996	59774060	65	65	NA	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	NA	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	NA	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	NA	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	NA	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	NA	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	NA	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly G (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	NA	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	NA	0,55	0	0	0	NA

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
149	Y	2655519	2655609	91	0	NA	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	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 150 amplikonból 92 amplikon teljes egészében a nagy konfidenciával azonosított genomi régiókban volt, 41 amplikon részleges átfedést mutatott az ilyen területekkel, 17 amplikon pedig nem volt átfedésben a NIST által meghatározott szekvenciákkal. Ismétléseként 10 000 koordináta adatait határozták meg összehasonlítás céljából. A nem variáns bázisazonosításokat a humán genom hg19-es referenciaszekvenciájával hasonlították össze. A pontossági eredmények az [12 táblázat](#) láthatók.

12 táblázat Az NA12878 minta csírvonalbeli eredményeinek egyezése az NIST adatbázissal

Minta	Amplikonok száma	Átlagos azonosítási arány	Valódi pozitív	Álnegatív	Valódi negatív	Álpozitív	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

A kilenc futtatásból álló csírvonal vizsgálat adatai alapján a(z) NextSeq 550Dx készülék konzisztens szekvenálást tud végezni az alábbi feltételek teljesülése esetén:

- GC-tartalom $\geq 19\%$ (a 819 szekvenált, 19% GC-tartalmú amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,6% sikertelen azonosítás mellett).
- GC-tartalom $\leq 87\%$ (a 819 szekvenált, 87% GC-tartalmú amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, nem fordult elő sikertelen azonosítás).
- PolyA hosszúsága ≤ 9 (a kilenc nukleotidból álló PolyA ismétlődést tartalmazó 819 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, nem fordult elő sikertelen azonosítás).
- PolyT hosszúsága ≤ 10 (a tíz nukleotidból álló PolyA ismétlődést tartalmazó 819 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, nem fordult elő sikertelen azonosítás).
- PolyG hosszúsága ≤ 7 (a hét nukleotidból álló PolyG ismétlődést tartalmazó 819 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 1,0% sikertelen azonosítás mellett).
- PolyC hosszúsága ≤ 6 (a hat nukleotidból álló PolyC ismétlődést tartalmazó 2457 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, nem fordult elő sikertelen azonosítás).
- Dinukleotid-ismétlődés hosszúsága ≤ 11 (a 11-szeres dinukleotid-ismétlődést tartalmazó 819 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,5% sikertelen azonosítás mellett).
- Trinukleotid-ismétlődés hosszúsága ≤ 5 (az 5-szörös trinukleotid-ismétlődést tartalmazó 819 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,5% sikertelen azonosítás mellett).
- Az inzerciók hossza ≤ 24 (819 szekvenált, 24 nukleotidból álló inzerciót tartalmazó amplikonban a 66 370 azonosított bázisból 66 343 azonosítása helyes volt, a sikertelen azonosítások aránya 1,2%; a 24 nukleotidos inzerciót tartalmazó részekben nem történt hibás azonosítás).

- A deléciók hosszúsága ≤ 25 (a 25 nukleotidból álló deléciót tartalmazó 2457 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, nem fordult elő sikertelen azonosítás).

Szomatikus

Az itt ismertetett vizsgálatban a Szomatikus variáns modul variánsazonosítási pontosságát mérték fel a(z) NextSeq 550Dx készülék készüléken, a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel.

A reprezentatív vizsgálatban 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist tartalmazó különböző géneket (150 amplikont) olvastak le. FFPE-blokkokból Platinum Genome DNS kivonásával hat egyedi mintát hoztak létre a vizsgálatban való értékeléshez.

A GM12877 minta DNS-ét hígították a GM12878 minta DNS-ével, létrehozva a GM12877-D5 és a GM12877-D7 mintát, amelyek 5%-os, illetve 7%-os gyakorisággal tartalmaztak egyedi heterozigóta variánsokat. Ugyanígy hígították a GM12878 minta DNS-ét a GM12877 minta DNS-ével, létrehozva a GM12878-D5 és a GM12878-D7 mintát. Mindegyik mintából három ismétlést vizsgáltak, kivéve a hígított mintákat, amelyekből egyenként hat ismétlést vizsgáltak. Összesen kilenc futtatást végeztek három szekvenálókészülékkel, három reagenstétellel, három kezelővel és öt különböző indítási napon történő kezdéssel. Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a pontosan jellemzett referencia-módszerrel, a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával. A konfidens genomterületek meghatározása e referencia-módszerrel való összehasonlítással történt, ha nincs másképpen megadva.

13 táblázat A szomatikus eredmények egyezésének összefoglalása

Kritérium	Összes megfigyelés ¹	Eredmény megfigyelés szerint ²	Eredmény futtatás szerint ³
Az SNV-k PPA-értéke	378	98,9	99,9
Az inzerciók PPA-értéke	378	96,9	99,9
A deléciók PPA-értéke	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Számítás: futtatásonkénti minták száma (42) x futtatások száma (9) = 378.

²A legalacsonyabb érték az egyes mintaismétlések mind a 9 futtatásból kapott adatainak összesített elemzésével.

³A legalacsonyabb érték az egyes futtatások adatainak összesített elemzésével.

A [14 táblázat](#) 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.

14 táblázat Szomatikus eredmények egyezése minták szerint

Minta	Átlagos azonosítási arány	Várt	Valódi pozitív	Álnegatív	Variáns azonosításának hiánya	Valódi negatív	Álpozitív	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

A 15 táblázat 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 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	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0

Minta	Várt	SNV-k		Várt	Inzerciók		Várt	Deléciók	
		Valódi pozitív	Álnegatív		Valódi pozitív	Álnegatív		Valódi pozitív	Álnegatív
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877- D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877- D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878- D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878- D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

A tíz mintát tovább elemezték a kis inzerciók és deléciók (indelek) azonosítása érdekében (16 táblázat). Összesen 71 olyan indelt találtak, amelyek mérete az inzerciók esetében 1–24 bp, illetve a deléciók esetében 1–25 bp volt.

16 táblázat A szomatikus indelek kimutatásának összefoglalása

Variáns típusa	Várt variánsok száma	Valódi pozitív	Álnegatív	Variáns azonosításának hiánya	PPA
Inzerció	10773	10282	9	482	99,2
Deléció	11502	10667	5	830	>99,9

A 150 amplikont úgy határozták meg, hogy lefedjenek különféle genomiális tartalmakat. Az amplikonok GC-tartalma 0,19–0,87% között volt. Az amplikonok tartalmaztak többféle, egy nukleotidot (például PolyA, PolyT), két nukleotidot és három nukleotidot tartalmazó ismétlődést is. Az adatokat amplikononként összesítették (17 táblázat), hogy meghatározzák a genom tartalmának hatását a helyes azonosítások százalékos arányára. A helyes azonosítások százalékos aránya a variáns- és referenciaazonosításokat is tartalmazza, és hibás vagy sikertelen azonosítás esetén kisebb mint 100%.

17 táblázat Szomatikus amplikonszintű pontosság

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	NA	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly G (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	NA	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	NA	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	NA	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	NA	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	NA	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly G (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	NA	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	NA	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	NA	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	NA	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly G (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	NA	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	NA	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	NA	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	NA	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
71	11	64418856	64418957	102	102	NA	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	NA	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	NA	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	NA	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	NA	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	NA	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	NA	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly G (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	NA	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
123	18	59773996	59774060	65	65	NA	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	NA	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	NA	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	NA	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	NA	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	NA	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	NA	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly G (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	NA	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	NA	0,55	0	0	0	NA

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Helyes azonosítások százalékos aránya
149	Y	2655519	2655609	91	0	NA	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	NA

A GM12878 minta szekvenálási eredményeit összehasonlították a National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) által az NA12878-ra megállapított, nagy konfidenciájú genotípussal. A 150 amplikonból 92 amplikon teljes egészében a nagy konfidenciával azonosított genomi régiókban volt, 41 amplikon részleges átfedést mutatott az ilyen területekkel, 17 amplikon pedig nem volt átfedésben a NIST által meghatározott szekvenciákkal. Ismétléseként 10 000 koordináta adatait határozták meg összehasonlítás céljából. A nem variáns bázisazonosításokat a humán genom hg19-es referenciaszekvenciájával hasonlították össze. A pontossági eredmények az [18 táblázat](#) láthatók.

18 táblázat A GM12878 minta szomatikus eredményeinek egyezése az NIST adatbázissal

Minta	Amplikonok száma	Átlagos azonosítási arány	Valódi pozitív	Álnegatív	Valódi negatív	Álpozitív	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

A kilenc futtatásból álló szomatikus vizsgálat adatai alapján a(z) NextSeq 550Dx készülék készülék konzisztens szekvenálást tud végezni az alábbi feltételek teljesülése esetén:

- GC-tartalom $\geq 19\%$ (a 378 szekvenált, 19% GC-tartalmú amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 2,6% sikertelen azonosítás mellett).
- GC-tartalom $\leq 87\%$ (a 378 szekvenált, 87% GC-tartalmú amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,6% sikertelen azonosítás mellett).
- PolyA hosszúsága ≤ 9 (a kilenc nukleotidból álló PolyA ismétlődést tartalmazó 378 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 2,5% sikertelen azonosítás mellett).
- PolyT hosszúsága ≤ 10 (a tíz nukleotidból álló PolyA ismétlődést tartalmazó 378 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, kevesebb mint 0,1% sikertelen azonosítás mellett).
- PolyG hosszúsága ≤ 6 (a hat nukleotidból álló PolyG ismétlődést tartalmazó 2268 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,5% sikertelen azonosítás mellett).
- PolyC hosszúsága ≤ 6 (a hat nukleotidból álló PolyC ismétlődést tartalmazó 756 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,4% sikertelen azonosítás mellett).
- Dinukleotid-ismétlődés hosszúsága ≤ 4 (a 4-szeres dinukleotid-ismétlődést tartalmazó 1890 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,9% sikertelen azonosítás mellett).
- Trinukleotid-ismétlődés hosszúsága ≤ 5 (az 5-szörös trinukleotid-ismétlődést tartalmazó 378 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 1,4% sikertelen azonosítás mellett).
- Inzerciók hosszúsága ≤ 23 (a 23 nukleotidból álló inzerciókat tartalmazó 378 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,8% sikertelen azonosítás mellett).
- A deléciók hosszúsága ≤ 25 (a 25 nukleotidból álló deléciókat tartalmazó 1134 szekvenált amplikon összes azonosított bázisának azonosítása helyes volt, 0,7% sikertelen azonosítás mellett).

Precizitás

A(z) NextSeq 550Dx készülék precizitásának meghatározásához 13 egyedi Platinum Genome mintát vizsgáltak három készüléssel, három reagenstétellel és három kezelővel, összesen kilenc szekvenálási futtatással, öt különböző indítási napon. A reprezentatív vizsgálat, a minták és a referencia-módszer megegyezik a pontossági vizsgálatnál leírtakkal. A precizitáshoz való hozzájárulást varianciakomponens-analízissel határozták meg, válaszváltozóként a VAF használatával; kiszámították a szórásokat a komponensek szintjén a készülék, a reagenstétel, a kezelő és a kezdőnap tekintetében (19 táblázat). Összesen 699 SNV, 176 inzerció és 235 deléció szerepelt a készülék, a kezelő, illetve a reagenstétel variabilitása mindegyik összetevőjének elemzésében.

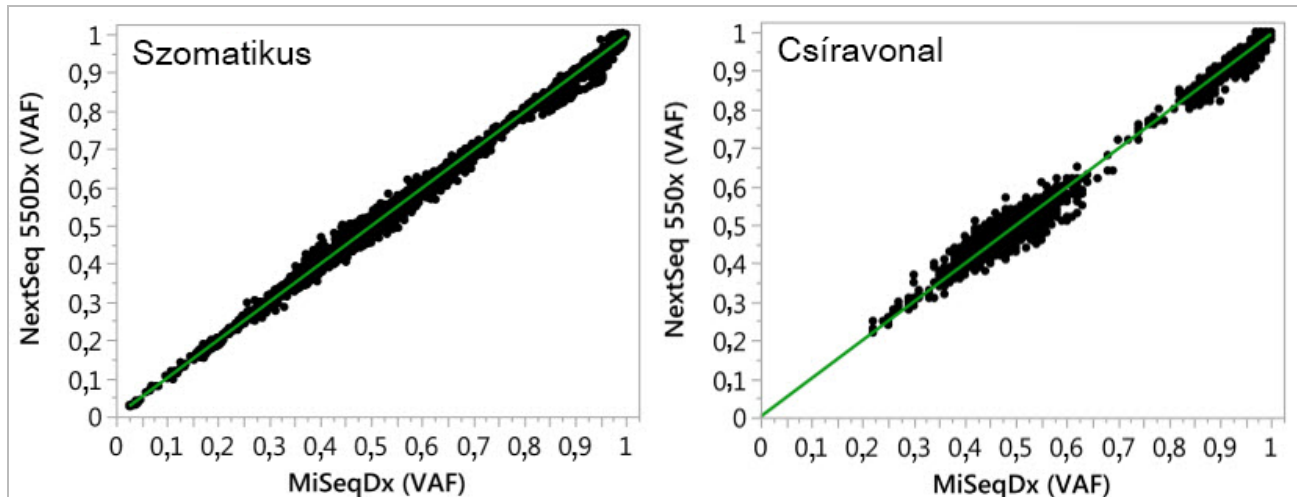
19 táblázat A NextSeq 550Dx készülék precizitási eredményei (szórás)

Komponens	Variáns típusa	Összetevő szórása		Teljes szórás	
		Maximális	Medián	Maximális	Medián
Tétel	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inzerció	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deléció	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Készülék	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Inzerció	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deléció	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Kezelő	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Inzerció	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deléció	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Nap	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Inzerció	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deléció	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Módszerek összehasonlítása (szekvenáló platform)

Teljesvér- és FFPE-mintákat vizsgáltak a(z) NextSeq 550Dx készülék segítségével és a MiSeqDx készülékkel, a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx csíravonal és szomatikus munkafolyamattal. A vér- és FFPE-minták variánsgyakoriságának egyezését több reprezentatív vizsgálatval értékelték. Az 2 ábra látható a VAF korrelációja a két készülék között egy reprezentatív vizsgálat esetén, és az 20 táblázat található a korreláció vizsgálati panelenkénti összefoglalása. Az MiSeqDx készülék és a(z) 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. A további részleteket lásd a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx terméktájékoztatójában.

2 ábra A MiSeqDx és a NextSeq 550Dx készülékekkel, az 1. vizsgálattal vizsgált FFPE-minták (bal oldalon) és vérminták (jobb oldalon) VAF-értékeinek korrelációja



20 táblázat A módszerek összehasonlításának eredményei egyedi vér- és FFPE-minták használatával

gDNS forrása	Vizsgálat (oligonukleotid-panel)	Biológiai ismétlések (minták)	Technikai ismétlések (mintánként)	Megfigyelések (variánsok száma)	Meredekség	Metszéspont	Korreláció (R ²)
Vér	1. vizsgálat	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Vér	2. vizsgálat	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	1. vizsgálat	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	3. vizsgálat	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Két adatpontot eltávolítottak a csírvonal variánsazonosító modulra vonatkozóan megadott korlátozás alapján.

²A 2. ábrán bemutatott VAF-diagramok meghatározási együtthatója.

Reprodukálhatóság

A(z) NextSeq 550Dx készülék esetén a reprodukálhatóságot Platinum Genome mintákon értékelték egy reprezentatív vizsgálattal, amelyet úgy terveztek, hogy különböző génekre kérdezzenek rá, amelyek 150 ampikonban, 23 különböző kromoszómán 12 588 bázist fednek le. A csírvonal vizsgálat 13 minta hét ismétléséből állt; a szomatikus vizsgálat hét, különböző VAF-szintű minta hat ismétléséből állt. A minták feldolgozása a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel történt.

A vizsgálatot három külső helyszínen végezték a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) egy tételével. Mindegyik helyszínen egy NextSeq 550Dx 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 futtatást. Így összesen 18 futtatás történt mind a csírvonal, mind a szomatikus munkafolyamat esetében.

Csírvonal

A $\geq 0,2$ VAF-értékű csírvonalbeli variánsok pozitívnak (variáns) minősülnek. A várhatóan pozitív csírvonalbeli variánsok esetében az egyes variánstípusokon (SNV, inzerció, deléció) belül a sikertelen azonosítási arányt és a helyes pozitív azonosítási arányt értékelték. Az [21 táblázat](#) foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidencia-intervallum alsó és felső határát (LCL/UCL), mindegyik variánstípus esetén.

21 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó csírvonalbeli azonosítási megfigyelések variánstípusonként

Variáns típusa	Nincs azonosítás			Helyes pozitív azonosítás				
	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Inzerciók	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Deléciók	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

A $< 0,2$ VAF-értékű csírvonalbeli variánsok negatívnak (vad típusú) minősülnek. A várhatóan negatív csírvonalbeli pozíciókon a sikertelen azonosítási arányt és a helyes vad típusú azonosítási arányt értékelték. A [22 táblázat](#) foglalja össze a megfigyelt arányokat és a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidencia-intervallum alsó és felső határát (LCL/UCL).

22 táblázat Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó csírvonalbeli azonosítási megfigyelések

Variáns típusa	Nincs azonosítás			Helyes negatív azonosítás				
	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	95% LCL	95% UCL
Vad típusú	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

A rendszer a $\geq 0,2$ és $< 0,7$ VAF-értékű csírvonalbeli variánsokat a variánsra pozitív heterozigótaként, a $\geq 0,7$ VAF-értékű variánsokat pedig a variánsra pozitív homozigótaként azonosítja. A heterozigóta variánsokat tartalmazó csírvonalbeli minták alapján határozták meg, hogy a vizsgálat inherens variabilitása befolyásolja-e a genotípus-azonosítást. Meghatározták a Cx értéket mindkét határérték esetében (0,2 a heterozigóta és 0,7 a homozigóta genotípusok esetében), ahol x a határértéket meghaladó ismétlések aránya. Az alsó 0,2-es VAF-határérték esetén a $Cx > 99,999\%$ volt, ami azt jelenti, hogy a vizsgálat a heterozigóta variánsok $> 99,999\%$ -át heterozigótaként azonosítja. A felső 0,7-es VAF-határérték esetén a $Cx \leq 0,001\%$ volt, ami azt jelenti, hogy a vizsgálat a heterozigóta variánsok $\leq 0,001\%$ -át azonosítja homozigótaként. A [23 táblázat](#) tartalmazza az eredményeket variánstípus szerint.

A rendszer a $\geq 0,2$ és $< 0,7$ VAF-értékű csírvonalbeli variánsokat a variánsra pozitív heterozigótaként, a $\geq 0,7$ VAF-értékű variánsokat pedig a variánsra pozitív homozigótaként azonosítja. A heterozigóta variánsokat tartalmazó csírvonalbeli minták alapján határozták meg, hogy a vizsgálat inherens variabilitása befolyásolja-e a genotípus-azonosítást. Meghatározták a Cx értéket mindkét határérték esetében (0,2 a heterozigóta és 0,7 a homozigóta genotípusok esetében), ahol x a határértéket meghaladó ismétlések aránya. Az alsó 0,2-es VAF-határérték esetén a $Cx > 99,999\%$, ami azt jelenti, hogy a vizsgálat a heterozigóta variánsok $> 99,999\%$ -át

heterozigótaként azonosítja. A felső 0,7-es VAF-határérték esetén a $C_x \leq 0,001\%$, ami azt jelenti, hogy a vizsgálat a heterozigóta variánsok $\leq 0,001\%$ -át azonosítja homozigótaként. A [23 táblázat](#) tartalmazza az eredményeket variánstípus szerint.

23 táblázat Csírvonalbeli heterozigóta variánsok C_x értékei

Variáns típusa	VAF-határértéke 0,2	VAF-határértéke 0,7
	$\geq C99,999\%$	$\leq C0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Inzerciók	24/24	24/24
Deléciók	35/35	35/35
Összes	153	153

Szomatikus

A $\geq 0,026$ VAF-értékű szomatikus variánsok pozitívnak (variáns) minősülnek. A $\geq 0,01$ és $< 0,026$ VAF-értékű megfigyeléseket az elemzés szempontjából nem egyértelműnek tekintettük (sem pozitív, sem negatív, alacsony gyakoriságú variáns). A teljesítmény értékeléséhez az eredményeket háromféle módszerrel számították:

- Legjobb eset: Minden nem egyértelmű eredményt helyes pozitív azonosításnak (a várt eredményekkel egyezőnek) tekintettek.
- Legrosszabb eset: Minden kétértelmű eredményt helytelen negatív azonosításnak (a várt eredményekkel nem egyezőnek) tekintettek.
- Kizárásos eset: Az elemzésből kizártak minden nem egyértelmű eredményt.

Az alábbi három táblázat, az [24 táblázat](#), a [25 táblázat](#) és a [26 táblázat](#) foglalja össze az azonosítás eredményeit a legjobb eset, a legrosszabb eset és a kizárásos eset értékelésével, valamint a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidencia-intervallum alsó és felső határát (LCL/UCL).

24 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó szomatikus azonosítási megfigyelések variánstípusonként (legjobb eset)

Variáns típusa	Helyes pozitív azonosítás			95% LCL	95% UCL
	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány		
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerciók	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Deléciók	18 381	18 381	100	99,98	100,00

25 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó szomatikus azonosítási megfigyelések variánstípusonként (legrosszabb eset)

Variáns típusa	Helyes pozitív azonosítás				
	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerciók	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Deléciók	18 381	18 381	100	99,98	100,00

26 táblázat Várhatóan pozitív eredményekre vonatkozó szomatikus azonosítási megfigyelések variánstípusonként (nem egyértelmű eredmények kihagyva)

Variáns típusa	Helyes pozitív azonosítás				
	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerciók	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Deléciók	18 381	18 381	100	99,98	100,00

A $< 0,01$ VAF-értékű szomatikus variánsok negatív (vad típusú) azonosításnak minősülnek. A várhatóan negatív szomatikus pozíciókon a sikertelen azonosítási arányt és a helyes vad típusú azonosítási arányt értékelték. A helyes vad típusú azonosítások számát úgy határozták meg, hogy a sikertelen azonosításokat kizárták, és az összes azonosítás számából kivonták azokat a megfigyelt azonosításokat, amelyek a nem egyértelmű zónába estek (VAF-érték $\geq 0,01$ és $< 0,026$), valamint a hibás azonosításokat, amelyek a határérték felett voltak (VAF-érték $\geq 0,026$). A [27 táblázat](#) foglalja össze a negatív szomatikus helyek sikertelen azonosítása és helyes vad típusú azonosítása megfigyelt és összes gyakoriságát, ezek százalékos arányát, illetve a Wilson-pontszám módszerrel megállapított 95%-os konfidencia-intervallum alsó és felső határát (LCL/UCL).

27 táblázat Várhatóan negatív eredményekre vonatkozó szomatikus azonosítási megfigyelések

Variáns Típus	Nincs azonosítás				Helyes azonosítás					
	Megfigyelt	Összes	Százalékos arány	Nem egyértelmű	Helytelen	Helyes	Összes	Százalékos arány	95% LCL	95% UCL
Vad típusú	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Az ugyanazon variánst különböző VAF-gyakorisággal tartalmazó szomatikus mintákat értékelték a vizsgálat C95 értékének meghatározásához (külön-külön az egyes variánstípusoknál). A vizsgálat határértékéhez közeli variabilitás értékeléséhez olyan mintákat használtak, amelyek várható VAF-értéke 0,02 és 0,07 között volt. Mindegyik variáns esetén meghatározták a C95 értéket; az [28 táblázat](#) a variánstípuson belüli legmagasabb C95 érték szerepel.

28 táblázat A szomatikus munkafolyamattal kapott C95-értékek összefoglalása

Variáns típusa	N	C95
----------------	---	-----

SNV	74	0,0613
Inzerció	24	0,0573
Deléción	33	0,0575

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles) készlet teljesítménye

Áttekintés

A(z) NextSeq 550Dx kétféle reagenskészlettel használható: a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel. Annak bizonyítására, hogy a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) megfelel a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) segítségével ellenőrzött és validált analitikai teljesítménykövetelményeknek, vizsgálatokat végeztek a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) segítségével. Két könyvtárkészítést végeztek a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx használatával, az egyiket a csírvonal munkafolyamattal, a másikat a szomatikus munkafolyamattal. Az egyes munkafolyamatokból származó könyvtárakat a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) három tételével és három NextSeq 550Dx készülékkel tesztelték. Ezenkívül az egyes munkafolyamatok tesztelése magában foglalt egy egyszeri futtatást a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel.

Analitikai szenzitivitás (vak-határérték, LoB és kimutatási határérték, LoD)

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) reagenskészlettel végzett hitelesítés eredményei szerint a(z) NextSeq 550Dx készülék képes volt a variánsok kimutatására 0,05 VAF esetén a II. típusú hiba $\leq 0,05$ valószínűsége mellett, és a szomatikus variánsazonosító modul által használt 0,026-os VAF-határérték (effektív LoB) esetén az I-es típusú hiba valószínűsége $\leq 0,01$. Ezek alapján az várható, hogy egy 0,05 VAF-értékű variáns mért értéke az esetek 95%-ában legalább 0,026 VAF, és a vad típusú pozíció mért értéke kevesebb mint 0,026 VAF az esetek 99%-ában. Annak ellenőrzésére, hogy ezek a jellemzők teljesíthetők-e a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) reagenskészlettel, ismételt mérések történtek a NextSeq 550Dx készüléken vad típusú mintákkal (LoB minták) és 0,05 VAF-gyakoriságú variánst tartalmazó mintákkal (LoD minták) a NextSeq 550 Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) termékkel. A 0,026-os határérték feletti és alatti azonosítások arányát ezután összehasonlították a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) készlettel megállapított állításokkal.

A teszteléshez két LoD-mintát használtak, amelyek mindegyike egyedi variánsokat tartalmazott, amelyek célértéke 0,05 VAF volt, valamint a megfelelő LoB-mintákat, amelyek vad típusúak voltak a célzott variánsok tekintetében. A könyvtárkészítéshez a LoD és LoB mintákat nyolc, illetve hét ismétlésben dolgozták fel a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx segítségével. A könyvtárakat először szekvenálták a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) segítségével a variánsok/genomikai koordináták azonosítása érdekében az LoB/LoD értékeléséhez a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) segítségével. A NextSeq

550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) eredményei alapján 0,045–0,055 közötti átlagos VAF értékkel rendelkező összes variánst (LoD-variánsok) felhasználták az LoD elemzéshez (N = 51 variáns). Az LoB vizsgálatához az ezekhez tartozó 51 genomi koordinátát értékelték.

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlet értékelésére a könyvtárakat három egymást követő napon, három futtatásban szekvenálták, ugyanazon készülékkal és reagenskészlettel. Ez összesen 24 ismétlést jelentett az 51 LoD-variáns mindegyike és 21 ismétlést a megfelelő vad típusú pozíciók mindegyike esetében. A < 0,026 VAF-értékű vad típusú azonosítások aránya az [29 táblázat](#) látható. A legalább 0,026 VAF-értékű LoD-variánsok azonosításának aránya a [30 táblázat](#) látható.

29 táblázat A < 0,026 értékű azonosítások aránya a vad típusú pozíciók esetében (az LoB vizsgálata)

Variáns Típus	Értékelt pozíciók	Összes megfigyelés	A VAF-mérések száma $\geq 2,6\%$	Arány < 2,6%	Az arány 95%-os konfidenciaintervalluma
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Inzerció	11	231	0	1	0,984–1
Deléción	8	168	0	1	0,978–1

30 táblázat A $\geq 0,026$ VAF-értékű LoD-variánsok azonosításának aránya (az LoD értékelése)

Variáns Típus	Értékelt pozíciók	Összes megfigyelés	A VAF-mérések száma < 2,6%	A VAF-mérések száma $\geq 2,6\%$	Arány $\geq 2,6\%$	Az arány 95%-os konfidenciaintervalluma
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Inzerció	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Deléción	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

Pontosság

Csíravonal

Az alábbi vizsgálatban a Csíravonal variánsazonosító modul variánsazonosítási pontosságát mérték fel a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel. Tizenkét egyedi Platinum Genome minta értékelése történt egy reprezentatív vizsgálattal. Összesen 11 futtatás történt három NextSeq 550Dx készülékkel és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) három tételével.

Az SNV-k, inzerciók és deléciónk kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a pontosan jellemzett referencia-módszerrel, a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával. A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) használatával végzett egyetlen szekvenálási futtatásból származó pontossági értékek is szerepelnek referenciaként. Az eredmények összefoglalása az [31 táblázat](#) található.

31 táblázat A csírvonalbeli eredmények egyezésének összefoglalása

Kritérium	Összes megfigyelés (v2.5) ¹	Eredmény megfigyelés szerint (v2.5) ²	Eredmény megfigyelés szerint (v2) ³	Eredmény futtatás szerint (v2.5) ⁴	Eredmény futtatás szerint (v2) ⁴
Az SNV-k PPA-értéke	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
Az inzerciók PPA-értéke	1056	100	100	100	100
A deléciók PPA-értéke	1056	95,2	95,2	> 99,9	> 99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Számítás: futtatásonkénti minták száma x futtatások száma (96 minta futtatásonként x 11 futtatás = 1056 megfigyelés).

²A legalacsonyabb megfigyelt érték az egyes mintaismétlések közül, minden futtatásnál (a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 készlettel végzett 11 futtatás alapján).

³A legalacsonyabb megfigyelt érték az egyes mintaismétlések közül, 1 futtatásban (összesen 96 megfigyelésből).

⁴A legalacsonyabb érték az egyes futtatások adatainak összesített elemzésével.

Szomatikus

A következő vizsgálatban a Szomatikus variánsazonosító modul variánsazonosítási pontosságát mérték fel a NextSeq 550Dx készüléken, a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel. Tíz Platinum Genome FFPE-mintát (ebből kettő esetében a variánsok VAF-értéke 0,05-ra volt hígítva) értékelték egy reprezentatív vizsgálatlaltal. Összesen 11 futtatás történt három NextSeq 550Dx készülékkel és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) három tételével.

Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a pontosan jellemzett referencia-módszerrel, a Platinum Genomes 2016-1.0-s verziójával. A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) használatával végzett egyetlen szekvenálási futtatásból származó pontossági értékek is szerepelnek referenciaként. Az eredmények összefoglalása az [32 táblázat](#) található.

32 táblázat A szomatikus eredmények egyezésének összefoglalása

Kritérium	Összes megfigyelés (v2.5) ¹	Eredmény megfigyelés szerint (v2.5) ²	Eredmény megfigyelés szerint (v2) ³	Eredmény futtatás szerint (v2.5) ⁴	Eredmény futtatás szerint (v2) ⁴
Az SNV-k PPA-értéke	528	100	100	100	100
Az inzerciók PPA-értéke	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9

A deléciók PPA-értéke	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Számítás: futtatásonkénti minták száma x futtatások száma (48 minta futtatásonként x 11 futtatás = 528 megfigyelés).

²A legalacsonyabb megfigyelt érték az egyes mintaismétlések közül, minden futtatásnál (a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 készlettel végzett 11 futtatás alapján).

³A legalacsonyabb megfigyelt érték az egyes mintaismétlések közül, 1 futtatásban (összesen 96 megfigyelésből).

⁴A legalacsonyabb érték az egyes futtatások adatainak összesített elemzésével.

Precizitás

Csíravonal

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel végzett csíravonal variánsazonosító modul pontosságát Platinum Genome minták reprezentatív vizsgálatával értékelték. A vizsgálatához egyetlen könyvtár elkészítése történt a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel, amely 12 mintát tartalmazott; ezeket egyenként nyolc ismétléssel vizsgálták. A könyvtárakat a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) három tételével és három NextSeq 550Dx készülékkel szekvenálták összesen kilenc szekvenálási futtatásban.

A heterozigóta variánsokat tartalmazó minták alapján határozták meg, hogy a vizsgálat inherens variabilitása befolyásolja-e a genotípus-meghatározást (N = 153 egyedi heterozigóta variáns). Meghatározták a Cx értéket csíravonal variánsazonosító modullal, mindkét határérték esetében (0,2 a heterozigóta és 0,7 a homozigóta genotípusok esetében), ahol x a határértéket meghaladó ismétlések aránya. Az alsó 0,2-es VAF határérték esetén a NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) esetében a minimális Cx értékű variáns > 99,9% volt, ami azt jelenti, hogy a heterozigóta variánsok > 99,9%-át heterozigótaként azonosítja. A felső, 0,7-es VAF határérték esetén a NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) esetében a maximális Cx értékű variáns < 1,5% volt, ami azt jelenti, hogy a heterozigóta variánsok ≤ 1,5%-át azonosítja homozigótaként. Az [33 táblázat](#) tartalmazza az eredményeket variánstípus szerint. A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) használatával végzett egyetlen szekvenálási futtatásból származó Cx-értékek is szerepelnek referenciaként.

33 táblázat Csíravonalbeli heterozigóta variánsok Cx értékei

Variáns típusa	N	VAF-határértéke 0,2		VAF-határértéke 0,7	
		Minimális Cx (v2.5) ¹	Minimális Cx (v2) ²	Maximális Cx (v2.5) ¹	Maximális Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9%	> 99,9%	1,5%	1,0%
Inzerciók	24	100%	100%	0%	< 0,1%
Deléciók	35	100%	> 99,9%	< 0,1%	< 0,1%

¹Cx-értékek a varianciakomponens-elemzésből származó teljes szórás becslése alapján.

²Cx-értékek a minta szórásai alapján.

Szomatikus

A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel végzett szomatikus variánsazonosító modul pontosságát FFPE Platinum Genome minták reprezentatív vizsgálatával értékelték. A vizsgálatához egyetlen könyvtár elkészítése történt a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel, amely két mintát tartalmazott; ezeket egyenként nyolc ismétléssel vizsgálták. A könyvtárakat a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) három tételével és három NextSeq 550Dx készülékkel szekvenálták összesen kilenc szekvenálási futtatásban.

A $\leq 0,10$ várható VAF-szintű szomatikus variánsok (N = 131 egyedi variáns) segítségével vizsgálták a készülék variabilitását a szomatikus variánsazonosító modul VAF-határértéke közelében ($a \geq 0,026$ VAF-szintű szomatikus variánsokat pozitívként azonosítja a variánsra vonatkozóan). Mindegyik szomatikus variáns esetében meghatározták a C95 értéket. A C95 azt a VAF-értéket jelenti, amelynél a szomatikus variáns modul VAF-határértékénél magasabb eredmény valószínűsége 95%. Az [34 táblázat](#) tartalmazza legmagasabb C95-értéket variánstípusonként. A NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) használatával végzett egyetlen szekvenálási futtatásból származó C95-értékek is szerepelnek referenciaként.

34 táblázat A szomatikus munkafolyamattal kapott C95-értékek összefoglalása

Variáns típusa	Értékelt variánsok száma	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Inzerciók	24	0,062	0,061
Deléciók	33	0,060	0,060

¹C95-értékek a varianciakomponens-elemzésből származó teljes szórás becslése alapján.

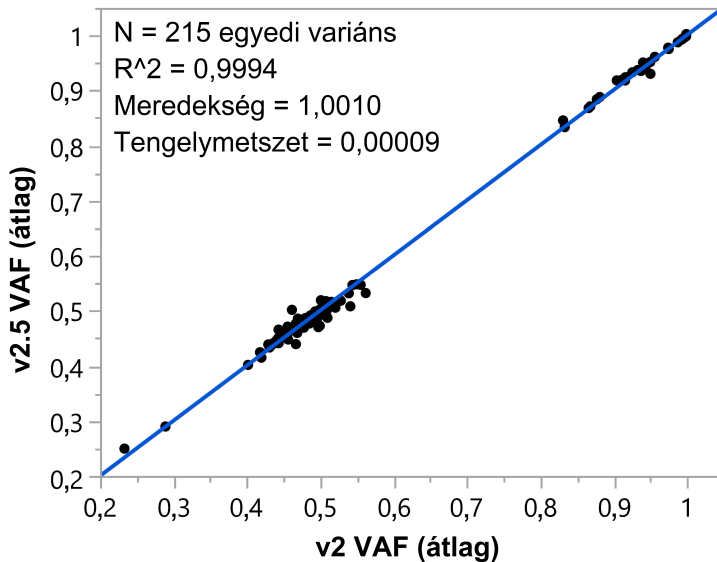
²C95-értékek a minta szórásai alapján.

Módszerek összehasonlítása (reagenskészlet)

Csíravonal

215 egyedi variáns átlagos VAF-ját a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel a csíravonal variánsazonosító modullal készült eredmények felhasználásával értékelték. A VAF átlagát 11 szekvenálási futtatásból (a v2.5 esetében), illetve egy szekvenálási futtatásból (a v2 esetében) számították ki. Az egyes variánsok átlagának kiszámításához legalább nyolc ismétlést használtak. Az [3 ábra](#) látható a VAF egyes reagenskészletek közötti korrelációja. Az erős lineáris VAF-korreláció és a reagenskészletek eredményeinek hasonlósága alapján az eredetileg a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a csíravonal variáns modul segítségével ellenőrzött és validált teljesítményjellemzőkről megállapítható, hogy a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) esetében is alkalmazhatók.

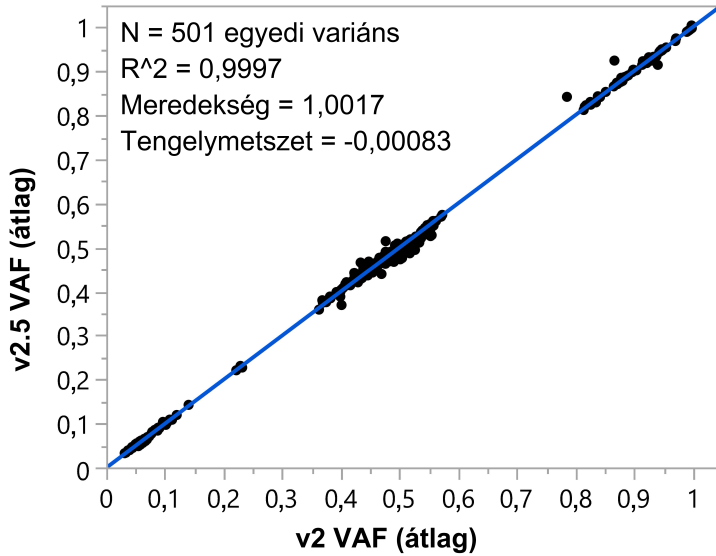
3 ábra A csírvonal variánsazonosító modul esetében a variáns allél gyakoriságának (VAF) korrelációja a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) között.



Szomatikus

501 egyedi variáns átlagos VAF-ját a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) készlettel a szomatikus variánsazonosító modullal készült eredmények felhasználásával értékelték. A VAF átlagát 11 szekvenálási futtatásból (a v2.5 esetében), illetve egy szekvenálási futtatásból (a v2 esetében) számították ki. Mindegyik egyedi variáns átlagának kiszámításához legalább három ismétlést használtak. Az [4 ábra](#) látható a VAF egyes reagenskészletek közötti korrelációja. A VAF-korreláció és a reagenskészletek eredményeinek hasonlósága alapján a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a szomatikus variánsazonosító modul segítségével ellenőrzött és validált teljesítményjellemzőkről megállapítható, hogy a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) esetében is alkalmazhatók.

4 ábra A szomatikus variánsazonosító modul esetében a variáns allél gyakoriságának (VAF) korrelációja a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) és a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) között.



Módosítási előzmények

Dokumentum	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 200031448 v00	2023. június	<p>Első kiadás.</p> <p>A korábbi 1000000030326 számú dokumentum helyébe ez lépett. Az új dokumentum változásai az 1000000030326 v6 dokumentumhoz képest:</p> <ul style="list-style-type: none"> Tartalom hozzáadva a NextSeq 550Dx készülékhez rendelkezésre álló opcionális Illumina DRAGEN szerverhez. Levegőszűrő cikkszama frissítve. <p>A 1000000030326 számú dokumentum korábbi módosításai:</p> <ul style="list-style-type: none"> Frissítésekre került sor a forrásszoftverből véletlenül hozzáadott tartalom helyesbítésére. Súlyos események jelentésével kapcsolatos nyilatkozat hozzáadása a Figyelmeztetések és óvintézkedések részhez. A rendeltetés szerinti felhasználóra vonatkozó nyilatkozat hozzáadása Az eljárás működési elve részhez. A High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) termékre való hivatkozás eltávolítása. A High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles) termékre való hivatkozás hozzáadása. Módosítási előzményeket tartalmazó táblázat hozzáadása. Az európai uniós meghatalmazott képviselő címének frissítése.

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 licencet 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).

© 2023 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

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

Elérhetőségek



Illumina, Inc.
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



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

Ausztrál szponzor

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

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.