

MiSeq™Dx készülék

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA
CSAK EXPORTÁLÁSI CÉLOKRA

Rendeltetés

Az MiSeqDx készülék célja a perifériás teljes vérből vagy formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetből kivont humán genomikus DNS-könyvtárak célzott szekvenálása, ha a készülékkel végzett *in vitro* diagnosztikai (IVD) vizsgálatokkal együtt használják. Az MiSeqDx készülék nem szolgál a teljes genom szekvenálására vagy *de novo* szekvenálásra. Az MiSeqDx készülék regisztrált és bejegyzett, engedélyezett vagy jóváhagyott IVD-reagensekkel és az elemzőszoftverrel való használatra szolgál.

Az eljárás alapelvei

Az Illumina MiSeqDx készülék rendeltetése humán DNS célzott újraszekvenálása a perifériás teljes vérből vagy formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetből kivont genomikus DNS-ből készített könyvtárak, Illumina szekvenálási fogyóeszközök, valamint regisztrált és bejegyzett, engedélyezett vagy jóváhagyott IVD-reagensek használatával. A könyvtárak készítése a célszekvenciák amplifikálásával és mintaindexek és befogószekvenciák hozzáadásával történik. A készülék a mintakönyvtárakat egy áramlási cellában rögzíti, és szintézissel végzett szekvenálás (SBS) kémiai módszerrel szekvenálja. Az SBS során az egyes nukleotidbázisok kimutatása reverzibilis terminációs módszerrel történik, amint azok beépülnek a növekvő DNS-szálakba. A valós idejű elemzési (RTA) szoftver képelemzést és bázisazonosítást végez, és minőségi pontszámot rendel minden bázishoz minden szekvenálási ciklusban. Amikor az elsődleges elemzés befejeződött, az MiSeqDx készülék elvégzi a másodlagos elemzés során a bázisazonosítások feldolgozását. A feldolgozás részét képezi jellemzően a demultiplexelés, a FASTQ-fájlok létrehozása, az illesztés, a variánsok azonosítása és a variánsazonosítás-formátum (VCF) fájlok létrehozása; utóbbiak a referenciagenom meghatározott helyein található variánsokról tartalmaznak adatokat. Az MiSeqDx a másodlagos elemzéshez különböző modulokat alkalmaz a munkafolyamattól függően.

Két rendszerből álló konfiguráció

A két rendszerből álló konfiguráció tartalmazza a hardvert, a szoftvert és a telepítési eljárásokat, amelyek lehetővé teszik, hogy az MiSeqDx készüléken mind *in vitro* diagnosztikai (IVD), mind a kizárólag kutatási célú (RUO) szekvenálási vizsgálatokat lehessen végezni. A két rendszerből álló konfiguráció lehetővé teszi, hogy a felhasználó válthasson a készülék diagnosztikai üzemmódja és

kutatási üzemmódja között. A szekvenálási fogyóeszközökön található rádiófrekvenciás azonosítók (RFID) megakadályozzák az RUO szekvenálási reagensek használatát diagnosztikai szekvenálási futtatásokhoz.

Az eljárás korlátai

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- A termékdokumentációban bemutatott eredményeket reprezentatív vizsgálati panelek segítségével kapták, a csírvonal munkafolyamat teljesítményjellemzői vizsgálatához perifériás teljes vér vagy sejtvonalak, a szomatikus munkafolyamathoz pedig FFPE-szövet vagy FFPE-sejtvonalak, valamint az ismertetett reagensek és szoftvermodulok használatával. A csírvonal variáns modul és a szomatikus variáns modul a teljesítmény reprezentatív tesztekkel történő értékelésére fejlesztették ki. A teljesítményjellemzők csak tájékoztató jellegűek. A bemutatott validációs tesztek csak a készülék általános tulajdonságait szemléltetik, és nem szolgálnak a készülék tulajdonságainak vagy alkalmasságának megállapítására semmilyen konkrét állítás tekintetében. Az ezen a készüléken történő használatra kifejlesztett valamennyi diagnosztikai teszt teljes körű validálást igényel minden teljesítménybeli szempont tekintetében.
- E termék csak a következő eredmények nyújtására alkalmas:
 - ≥ 5 Gb szekvenálási teljesítmény 2×150 bp beolvasási hossz esetében
 - ≥ 15 millió, a szűrőn átmenő beolvasás 2×150 bp beolvasási hossz esetében
 - 2×150 bp beolvasási hosszúságnál a Q30 $\geq 80\%$
A bázisok legalább 80%-ának Phred-skála szerinti minőségi pontszáma 30 feletti, ami 99,9%-nál nagyobb bázisazonosítási pontosságot jelez.
- Az MiSeqDx készülék csak perifériás vérből vagy FFPE-szövetből kivont humán DNS-könyvtárak szekvenálására van hitelesítve. Ezzel a készülékkel ne használjon másféle mintákból készített könyvtárakat *in vitro* diagnosztika céljára. Nincs megállapítva a készülék teljesítménye klinikai mintákból származó mikrobák vagy vírusok nukleinsavainak szekvenálásában.
- Az MiSeqDx készülék regisztrált és bejegyzett, engedélyezett vagy jóváhagyott IVD-reagensekkel vagy vizsgálatokkal való *in vitro* diagnosztikai használatra szolgál. Az ebben a betegtájékoztatóban leírt, reagensekre vonatkozó korlátozások és teljesítményjellemzők reprezentatív vizsgálatokon és szoftvermodulokon alapulnak. IVD-vizsgálatok esetében a rendeltetésszerű felhasználás, a kimutatott variánsok és a mintatípus tekintetében olvassa el a vizsgálat terméktájékoztatóját.
- A 25 bp méretnél nagyobb indeleket (inzerciók, deléciók és ezek kombinációi) a vizsgálati szoftver nem illeszti. Ez azt jelenti, hogy a 25 bp méretnél nagyobb indelek nem mutathatók ki a szoftverrel.
- A rendszer hitelesítve van az egynukleotid-variánsok (SNV) és a legfeljebb 25 bp hosszúságú deléciók és legfeljebb 24 bp hosszúságú inzerciók kimutatására a csírvonal és a szomatikus variáns modul szoftverrel. A szomatikus azonosításra 0,05 variánsgyakoriság esetén 25 bp méretű deléciók és 18 bp méretű inzerciók kimutatását vizsgálták.

- Előfordulhat, hogy a szélsőséges tartalmú variánsokat tartalmazó amplikonkiolvasásokat a vizsgálati szoftver nem illeszti, 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 amplikon (a próbaterületek kivételével) méretének több mint 4%-át kitevő SNV-t tartalmazó kiolvasások.
 - Legfeljebb 30 bp hosszúságú, a teljes amplikon méretének (a próbaterületekkel együtt) több mint 10%-át kitevő SNV-t tartalmazó kiolvasások.
- A nagy kiterjedésű variánsok, beleértve a több nukleotidból álló variánsokat (MNV-k) és a nagy indeleket, a kimeneti VCF-fájlban kisebb különálló variánsokként szerepelhetnek.
- A deléciós variánsok kiszűrésre vagy kihagyásra kerülhetnek, ha több két, egymás melletti amplikonra terjednek ki, ha a deléción legalább olyan hosszú, mint a két amplikon közötti átfedés.
- A rendszer nem tudja kimutatni a közvetlenül egy primer mellett elhelyezkedő indeleket, ha nincs átfedő amplikon. Az átfedő amplikonokat tartalmazó területeken a vizsgálat nem tudja kimutatni a deléciókat, ha az átfedési terület kisebb a kimutatandó deléción méreténél. Például, ha két egymás melletti amplikon közötti átfedés két (2) bázispár, a vizsgálat nem tudja kimutatni azokat a deléciókat, amelyek mindkét bázist tartalmazzák. A két bázis közül az egyik deléciója kimutatható.
- Mint minden hibridizációs alapú könyvtár-előkészítési munkafolyamat esetén, az oligonukleotid-kötő területeket érintő polimorfizmusok, mutációk, inzerciók és deléciók befolyásolhatják a vizsgált allélokat. Ezért befolyásolják a szekvenálással kapott azonosításokat is. 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.
- Előfordulhat az indel kiszűrése, ha egy kiolvasás végéhez közel lépnek fel, és az illesztés során puha levágásra kerülnek.
- A kis méretű MNV-k hitelesítése nem történt meg.
- A másolatszám variánsai és a szerkezeti variánsok, például a fúziók és a transzlokációk hitelesítése nem történt meg.
- Csak a csírvonal munkafolyamatra vonatkozó korlátozások:
 - Az MiSeqDx készüléken használt csírvonal variánsazonosító modul a csírvonalbeli variánsok kvalitatív azonosítása eredményének a meghatározására szolgál (például homozigóta, heterozigóta, vad típus).

- A csírvonal variáns modul használata esetén a pontos variánsazonosításhoz szükséges amplikononkénti másolatszám 150. 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 fájljokból. 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 9 ismétlődés szükséges a variáns kiszűréséhez, és csak legfeljebb 5 bp hosszúságú ismétlésekre vonatkozik (R5x9).
- Csak a szomatikus munkafolyamatra vonatkozó korlátozások:
 - Az MiSeqDx készüléken használt szomatikus variáns modul a szomatikus variánsok azonosítására vonatkozó kvalitatív eredmények készítésére szolgál (legalább 0,026 gyakoriságú szomatikus variáns jelenléte, kimutatási határérték: 0,05).
 - A szomatikus variáns modul használata esetén a pontos variánsazonosításhoz szükséges amplikononkénti másolatszám oligonukleotid-keverékenként 450. A minták mérete és az összes vizsgált bázis száma befolyásolja ezt a másolatszámot. A GC-tartalom és más genomikus tartalmak befolyásolhatják a másolatszámot.
 - Bizonyos, ismétlődő tartalmú környezetben található variánsok kiszűrésre kerülnek a VCF fájljokból. 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 szomatikus variánsok azonosítása esetén a referenciagenomban legalább 6 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

Az Illumina MiSeqDx a következőket tartalmazza:

MiSeqDx készülék (cikkszám: DX-410-1001)

Az MiSeqDx készülék működéséhez és az adatelemzéshez a következő szoftverkomponensek szükségesek:

Szoftveralkalmazás	Funkció	Leírás
MiSeq operációs szoftver (MOS)	A készülék működésének vezérlése	Az MOS szoftveralkalmazás kezeli a készülék működését a szekvenálás során, és képeket készít a valós idejű elemzési szoftver (RTA) számára. További tájékoztatásért lásd: <i>MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v4-hez (dokumentumszám: 200010452)</i> .
Valós idejű elemzés (RTA)	Az elsődleges elemzés elvégzése	Az RTA szoftveralkalmazás az MOS által a szekvenálási futtatás minden ciklusában minden csempéről készült képeket bázisazonosító fájllokká alakítja, amelyek a Local Run Manager elemzési moduljainak bemenetét képezik. 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 másodlagos elemzést és az állapot nyomon követését végzi. További tájékoztatásért lásd: <i>Az MiSeqDx készüléken futó Local Run Manager v3 szoftver referencia-útmutatója (dokumentumszám: 200003931)</i> .

Tárolás és kezelés

Paraméter	Műszaki adatok
Hőmérséklet	Szállítás és tárolás: -10 °C és 40 °C (14 °F és 104 °F) között. Működtetés: 19 °C és 25 °C (66 °F és 77 °F) között.
Páratartalom	Szállítás és tárolás: Nem kondenzálódó páratartalom. Működtetés: 30–75% relatív páratartalom (nem kondenzálódó).

Szükséges, de nem szállított eszközök és anyagok

Szekvenálási fogyóeszközök

MiSeqDx reagenskészlet v3 (cikkszám: 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (cikkszám: 20063860)

A felhasználó által beszerzett fogyóeszközök

A futtatás megkezdése előtt győződjön meg arról, hogy megvannak a következő, a felhasználó által beszerzett fogyóeszközök.

Fogyóeszköz	Cél
70%-os izopropil-alkohollal átitatott törülköndők vagy 70%-os etanol	Az áramlási cella üvegfelületének és emelvényének tisztítása
Szöszmentes laboratóriumi törülköndő	Az áramlási cella emelvényének tisztítása
Lencsetisztító papír, 4 x 6 hüvelyk (10 x 15 cm)	Az áramlási cella tisztítása
Tween 20	A készülék mosása
Négyzetes végű műanyag csipesz (opcionális)	Az áramlási cella eltávolítása az áramlási cella szállítási csomagolásából
Laboratóriumi minőségű víz	A készülék mosása

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 (M Ω) ellenállású víz
- Milli-Q víz
- Super-Q víz
- Molekuláris biológiai minőségű víz

Figyelmeztetések és óvintézkedések



VIGYÁZAT!

Ezek a reagensek potenciálisan veszélyes vegyszereket 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.

- 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).
- Az eljárások követésének elmulasztása hibás eredményeket vagy a minta minőségének jelentős romlását okozhatja.
- Használja a rutinszerű laboratóriumi óvintézkedéseket. Ne pipettázzon szájjal. Ne étkezzon, igyon vagy dohányozzon a munkaterületként megjelölt területeken. A minták és a készlet reagensei kezelésekor viseljen eldobható gumikesztyűt és laboratóriumi köpenyt. A minták és a készlet reagensei kezelése után alaposan mosson kezet.

- Megfelelő laboratóriumi gyakorlat és jó laboratóriumi higiénia szükséges annak megelőzéséhez, hogy a PCR-termékek szennyezzék a reagenseket, az eszközöket és a genomikus DNS-mintákat. A PCR-termékekkel való szennyeződés pontatlan és megbízhatatlan eredményeket okozhat.
- A szennyeződés elkerülése érdekében ügyeljen arra, hogy az amplifikáció előtti és az az utáni területeken külön berendezések és fogyóeszközök legyenek (például pipetták, pipettahegyek, fűtőblokkok, vortexelő és centrifugák).
- Ha szükséges, az indexek és minták párosításának pontosan meg kell felelnie a kinyomtatott lemezrendezésnek. 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.
- A számítógép vírusok elleni védelme érdekében határozottan ajánlott a felhasználó által biztosított vírusirtó szoftver telepítése. A telepítési utasításokat lásd a használati útmutatóban.
- Az MiSeqDx készüléket csak a panelek megbontása nélkül szabad működtetni. A készülék eltávolított panelek melletti működtetése hálózati feszültségnek és egyenfeszültségnek való potenciális kitétséget jelent.
- Ne érintse meg az áramlási cella emelvényét az áramlási cella rekeszében. Az itt található fűtő hőmérséklete 22 °C és 95 °C között változik, és égési sérülést okozhat.
- A készülék tömege körülbelül 126 font (57 kg), és leejtés vagy nem rendeltetésszerű kezelés esetén súlyos sérülést okozhat.
- A termékkel kapcsolatos súlyos eseményeket haladéktalanul jelentse az Illumina vállalatnak és a felhasználó és/vagy a páciens lakhelye szerinti tagállam illetékes hatóságának.

Használati útmutató

Az MiSeqDx készülék következő használati utasításaihoz az MiSeqDx reagenskészlet v3 reagensei szükségesek.

Futtatás létrehozása a Local Run Manager szoftverrel

A futtatás létrehozásával kapcsolatos részletes adatokat lásd: *Az MiSeqDx készüléken futó Local Run Manager v3 szoftver referencia-útmutatója (dokumentumszám: 200003931)* és a Local Run Managerben használt elemzési modul útmutatója.

A reagenskazetta előkészítése

A következő utasítások leírják, hogyan olvassa fel a reagenseket szoba-hőmérsékletű vízfürdőben.

1. Vegye ki a reagenskazettát a -15 és -25 °C közötti tárolóból.
2. Helyezze a reagenskazettát egy vízfürdőbe, amely annyi szoba-hőmérsékletű ionmentes vizet tartalmaz, hogy a reagenskazetta alja belemerüljön a kazettára nyomtatott, a vízszintet jelző vonalig. Ne hagyja, hogy a víz a maximális vízszintet jelző vonalnál magasabban álljon.

1. ábra: Maximális vízszintet jelző vonal



3. Hagyja a reagenskazettát felolvadni a szoba-hőmérsékletű vízben körülbelül 60–90 percig, amíg teljesen fel nem olvadt.
4. Vegye ki a kazettát a vízfürdőből, és óvatosan ütögesse az asztalhoz, hogy az aljából kiszabaduljon a víz. Szárítsa meg a kazetta alját. Győződjön meg arról, hogy a reagenskazetta tetejére nem fröccsent víz.

A reagenskazetta ellenőrzése

1. Fordítsa meg tízszer a reagenskazettát, hogy a felolvasztott reagensek összekeveredjenek, majd ellenőrizze, hogy mindegyik pozícióban felolvadt-e a reagens.
2. Ellenőrizze az 1., 2. és 4. pozícióban lévő reagenseket, hogy teljesen összekeveredtek-e, és nem tartalmaznak-e csapadékot.

MEGJEGYZÉS A megfelelő szekvenálás érdekében kritikus fontosságú, hogy a kazettában lévő reagensek teljesen fel legyenek olvadva és össze legyenek keveredve.

3. Óvatosan ütögesse a kazettát az asztalhoz, hogy csökkentse a reagensekben lévő légbuborékok mennyiségét.

MEGJEGYZÉS Az MiSeqDx készülék a szívócsöveket az egyes tartályok aljára süllyeszti a reagensek leszívásához, ezért fontos, hogy a tartályok buborékmentesek legyenek.

4. Helyezze a reagenskazettát jégre, vagy tegye félre $2-8$ °C hőmérsékletre (legfeljebb hat órára) a futtatás megkezdéséig. A legjobb eredmények érdekében közvetlenül folytassa a minta betöltésével és a futtatás előkészítésével.

Minták előkészítése a szekvenáláshoz

A mintakönyvtárak szekvenálásra való előkészítésére vonatkozó utasításokat, beleértve a könyvtárak hígítását és összekeverését, lásd a könyvtár-előkészítési készlet terméktájékoztatójának Használati útmutató fejezetét.

A mintakönyvtárak hígítása az oligonukleotid-keverékek összetettségétől függ. Az MiSeqDx-en a klasztersűrűség optimalizálása szükséges, és az optimális klasztersűrűség az adott könyvtárkészítési próbától függően változik.

Mintakönyvtárak betöltése a kazettába

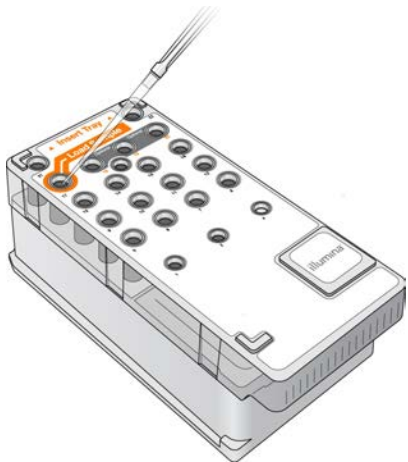
Amikor a reagenskazetta teljesen felolvadt és használatra kész, betöltheti a mintákat a kazettába.

1. Egy csak erre használt, tiszta és üres 1 ml-es pipettahegygel lyukassza át a reagenskazetta **Load Samples** (Minták betöltése) feliratú tartálya feletti zárófóliát.

MEGJEGYZÉS Ne lyukassza ki a többi pozícióban lévő reagensek fóliáját. A többi reagens kilyukasztása automatikusan történik a futtatás során.

2. Pipetázzon 600 µl előkészített hígított amplikonkönyvtár (DAL) mintakönyvtárakat a **Load Samples** (Minták betöltése) feliratú tartályba. Ügyeljen, hogy ne érjen hozzá a zárófóliához.
3. A minta betöltése után ellenőrizze, hogy nincsenek-e légbuborékok a tartályban. Ha légbuborékok vannak jelen, óvatosan ütögesse a kazettát az asztalhoz, hogy a buborékok eltávozzanak.

2. ábra: A könyvtárak betöltése



4. Az MiSeq kezelőszoftver (MOS) felületén lépjen közvetlenül a futtatás beállítási lépéseihez.

Futtatás beállítása

A futtatás beállítására vonatkozó részletes utasításokat lásd: *MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v4-hez (dokumentumszám: 200010452)*.

1. Jelentkezzen be az MiSeqDx rendszerbe a Local Run Manager szoftverhez tartozó jelszóval.
2. Az MOS szoftver Home (Kezdőképernyő) képernyőjén válassza a **Sequence** (Szekvencia) 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 Reagents (Reagensek behelyezése), Review (Áttekintés) és Pre-Run check (Futtatás előtti ellenőrzés).
4. Ha a Load Flow Cell (Áramlási cella behelyezése) képernyő megjelenik, tisztítsa meg és helyezze be az áramlási cellát.
5. Zárja be az áramlási cella reteszét és az áramlási cella rekeszének ajtaját.
Mind a retesznek, mind a rekesz ajtajának zárva kell lennie a futtatás elindítása előtt. Az áramlási cella behelyezésekor a szoftver beolvassa és rögzíti az RFID-t. A képernyő jobb alsó sarkában megjelenik egy visszaigazolás arról, hogy az RFID beolvasása sikeresen megtörtént.
6. Kövesse a szoftver utasításait az MiSeqDx SBS oldat (PR2) palackjának behelyezéséhez, győződjön meg arról, hogy a hulladékpalack üres, és helyezze be a reagenskazettát.
Az MiSeqDx SBS oldat (PR2) palackja és a reagenskazetta behelyezésekor a szoftver beolvassa és rögzíti az RFID-t. A képernyő jobb alsó sarkában megjelenik egy visszaigazolás arról, hogy az RFID beolvasása sikeresen megtörtént.
7. 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

Az integrált valós idejű elemzési (RTA) szoftver képelemzést és bázisazonosítást végez, és minőségi pontszámot rendel minden bázishoz minden szekvenálási ciklusban. Amikor az elsődleges elemzés befejeződött, az MiSeqDx készüléknek a [Futtatás létrehozása a Local Run Manager szoftverrel, 8. oldal](#) szerint kiválasztott modulja elkezd a másodlagos elemzést. Más munkafolyamatok esetében lásd a vizsgálathoz tartozó dokumentációt.

Minőség-ellenőrzési eljárások

Az MiSeqDx szoftver minden egyes futtatást, mintát és bázisazonosítást értékeli a minőség-ellenőrzési mérőszámok alapján. Szükség esetén a könyvtárkészítésben szereplő pozitív és negatív kontrollokat is értékelni kell a várt eredmények szempontjából.

Teljesítményjellemzők

Minden vizsgálatot az MiSeqDx készüléken végeztek.

A csírvonal-vizsgálatokban az MiSeqDx tisztás fibrózis 139 variánst tartalmazó vizsgálat vagy a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx reagenseit használták a könyvtárkészítéshez. A két készlet könyvtárkészítési reagensei azonosak, és a munkafolyamat csak egyetlen lépésben különbözik: a polimeráz-láncreakciós (PCR) ciklusok számában (25, illetve 28). A TruSeq Custom Amplicon Kit Dx esetében a PCR-ciklusok nagyobb száma lehetővé teszi az alacsonyabb bemeneti DNS-mennyiséget (50 ng) az MiSeqDx tisztás fibrózis 139 variánst tartalmazó vizsgálat termékhez képest (250 ng), amit a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel végeztek, a bemeneti DNS-mennyiséget értékelő vizsgálatban mutattak ki. Az MiSeqDx tisztás fibrózis 139 variánst tartalmazó vizsgálat reagenseivel készített könyvtárakat a készlethez tartozó szekvenáló reagensekkel szekvenálták. A TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel készített könyvtárakat az MiSeqDx reagenskészlet v3 készlettel szekvenálták. Az utóbbi szekvenáló reagensek az MiSeqDx tisztás fibrózis 139 variánst tartalmazó vizsgálat reagenseihez képest nagyobb mennyiségű kimenetet biztosítanak.

A vizsgálat az MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro által támogatott mintafeldolgozási teljesítménytartományokat támogatja. Az MiSeqDx futtatásonként 1–96 mintát támogat a vizsgálat típusától függően. Az MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro bizonyos vizsgálatok esetén e tartomány alacsonyabb részébe eső mintafeldolgozási teljesítményekre készült.

A szomatikus variánsokat tanulmányozó vizsgálatokban a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx és az MiSeqDx reagenskészlet v3 készletet használták.

A TruSeq Custom Amplicon Kit Dx esetében a szekvenáláshoz szükséges könyvtárak előkészítéséhez leírt csírvonal vagy szomatikus munkafolyamatok után a csírvonal variáns modullal, illetve a szomatikus variáns modullal végeztek elemzést, két kivétellel. A reprezentatív mutációs panelként egygénes (csírvonalbeli vizsgálati teljesítmény, MiSeqDx tisztás fibrózis 139 variánst tartalmazó vizsgálat), illetve kétgénes pannellel (szomatikus vizsgálati teljesítmény) végzett vizsgálatok az illető vizsgálatra specifikus munkafolyamattal és elemzési modulokkal történtek.

MEGJEGYZÉS Az amplikon genomikus tartalma a szekvenált DNS-szállra vonatkozóan van összefoglalva. A mínusz szál alapján készült amplikonok esetében a referenciagenom az ellentétes szál tartalmát jelenti (például a mínusz szálon található amplikonok PolyA régiói megfelelnek a referenciagenom PolyT régióinak).

A teljesítményjellemzők számításaiban használt definíciók

- 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 álnegatívok (FN)
- 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 negatívok (TN). A vizsgálat által variánsként azonosított, valójában vad típusú locusok az álpozitívak (FP)
- A teljes százalékos egyezés (OPA) a vizsgálat által a referencia-módszernek megfelelően azonosítottak aránya.
 - $((\text{a vizsgálat által helyesen variánsként azonosított locusok száma}) + (\text{a vizsgálat által helyesen vad típusúként azonosított locusok száma})) / ((\text{variáns locusok teljes száma}) + (\text{vad típusú locusok teljes száma}))$
- A variánsazonosítási alkalmazásokhoz a PPA, NPA és OPA számításában nem szerepelnek a sikertelen azonosítások (valamelyik minőségi szűrőnek meg nem felelő variáns vagy referencialocusok). Két vizsgálatban külön szerepelnek a nem azonosított locusok a „helyes azonosítások aránya” mérőszámon belül, és ez meg van jelölve a megfelelő táblázatokban.
- Az azonosítási arány a szűrőknek megfelelő locusok száma osztva a szekvenált, az 1–22. kromoszómán található pozíciók számával. Az X- és az Y-kromoszómát nem tartalmazza az elemzés. Ebben a mérőszámban nincs figyelembe véve, hogy az azonosítások megegyeznek-e a referencia-módszer eredményével.

A preanalitikai tényezőkkel (például extrakciós módszerek vagy DNS-beviteli adatok) kapcsolatos teljesítményjellemzőket lásd az alkalmazott könyvtárkészítési módszerhez tartozó terméktájékoztatóban.

Mintaindexelés

A könyvtárkészítés során hozzáadott mintaindexprimerek egy egyedi szekvenciát rendelnek minden egyes minta DNS-éhez, lehetővé téve több minta összevonását egyetlen szekvenálási futtatásban. A mintaindexelést csírvonalbeli és szomatikus munkafolyamatok esetében vizsgálták.

Összesen 96 mintaindexet vizsgáltak egy reprezentatív vizsgálatban, amelyben mind a 23 emberi kromoszómán elhelyezkedő géneket, összesen szálanként 12 588 bázist lefedő területeket kérdeztek le, annak ellenőrzése érdekében, hogy a vizsgálat képes-e következetesen genotipizálást végezni egy adott minta esetében különböző indexprimer-kombinációk esetén. Az Y-kromoszóma nem tartalmaz konfidens területeket, ezért nem került értékelésre. Nyolc egyedi mintát teszteltek, mintánként 12 különböző indexprimer-kombinációval. A csírvonalbeli modul eredményeit a Platinum Genomes 2016-01-es verziójával hasonlították össze. A PPA (SNV-k és indelek esetében) meghaladta a 97%-ot (a valódi pozitív azonosítások száma SNV-k esetében legalább 70, inzerciók esetében 38, deléciók esetében 36 volt), az NPA pedig 100% (indexkombinációnként legalább 23 440 referenciapozíció) mind a 96 indexkombináció esetében. Ettől függetlenül vizsgáltak egyetlen indexet annak igazolására, hogy az MiSeqDx reagenskészlet v3 kémiai reakciója nyolcnál kevesebb minta esetében is helyesen működik-e (a korábbi reagenskészlet, az MiSeqDx Universal Kit 1.0 csak nyolc vagy több mintával volt használható). Az egy indexszel végzett vizsgálatban a PPA értéke 98,9% (180/182) volt az SNV-k esetében, 100% (38/38) az inzerciók esetében és 100% (46/46) a deléciók esetében. Az NPA 100% volt (23 856/23 856).

Egy minta tizenkét ismétlését (24 könyvtár) tesztelték az index pontosságának mérésére 0,05–0,10 gyakoriságú szomatikus variánsokkal a szomatikus variáns modullal (ismétlésenként két indexkombinációt használtak a szomatikus azonosításokhoz). A PPA 100% volt az SNV-k (64/64), az inzerciók (11/11) és a deléciók (19/19) esetében. Az NPA 100% volt (indexkombinációnként legalább 11 590 referenciapozíció) minden indexkombináció esetében.

Mintaátvitel

Az MiSeqDx készülék munkafolyamat során többféle minta és kontroll könyvtár-előkészítése és szekvenálása történik egyidejűleg. A mintaátviteli vizsgálatban azt értékelték, hogy a könyvtár-előkészítés során az egyik üregből a másikba történő mintaátvitel vagy az egymás utáni futtatások közötti szennyeződés miatti álpozitív eredmények érintik-e a vizsgálati eredményeket. Szomatikus variánsokat vizsgáltak, mert ezek kimutathatók alacsonyabb allélgyakoriság esetén, mint a csírvonalbeli variánsok.

Két reprezentatív vizsgálat által kimutatott különböző mutációkat hordozó négy sejtvonalból származó DNS-mintákat vizsgáltak. A minták közül az egyik egy pozícióban mutációt tartalmazott, a másik pedig vad típusú volt.

Az egyik üregből a másikba történő mintaátvitel definíció szerint olyan hibamód, amely a manuális feldolgozási lépések (pipettázás, minták keverése stb.) során keletkezik. Az egyik mintaüregből a másikba történő mintaátvitel értékeléséhez két vizsgálati futtatás történt:

- Két mintát, nagy mennyiségű genomikus DNS-t (gDNS) és az 1. gén mutációját tartalmazó, illetve kis mennyiségű gDNS-t és a 2. gén mutációját tartalmazó mintát helyeztek egy lemez pozícióira felváltva, sakktabla-elrendezésben.
- Két mintát, nagy mennyiségű gDNS-t és a 2. gén mutációját tartalmazó, illetve kis mennyiségű gDNS-t és az 1. gén mutációját tartalmazó mintát helyeztek egy másik lemez pozícióira felváltva, sakktabla-elrendezésben.

Mindegyik futtatásnál összesen 12 ismétlést értékelték álpozitív eredmények szempontjából (vagyis ha az 1. gén mutációját találták a 2. gén mutációját tartalmazó változatként megjelölt mintában vagy fordítva).

A futtatások közötti mintaátvitel definíciója az előző szekvenálási futtatásból esetleg megmaradt anyag által okozott hibamód. A szekvenálási futtatások közötti mintaátvitel meghatározása érdekében két lemezt futtattak, mindkettő egyetlen nagy bemeneti gDNS-mennyiségű minta 11 ismétlését és egy vakmintát tartalmazott, amelyeket egymás után szekvenáltak egy MiSeqDx készüléken, és értékelték az álpozitív eredményeket. Az első futtatás a 2. gén mutációját tartalmazó 11 ismétlést és egy vakmintát tartalmazott. A második futtatás az 1. gén mutációját tartalmazó 11 ismétlést és 1 vakmintát tartalmazott. Először a 2. gén mutációját tartalmazó mintakönyvtárat szekvenálták, majd az 1. gén mutációját tartalmazó mintakönyvtárat szekvenálták, majd ismét a 2. gén mutációját tartalmazó mintakönyvtárat. Ha a 2. gén mutációját lehetne megfigyelni a csak az 1. gén mutációját tartalmazó futtatásban, vagy fordítva, ez mintaátvitelt jelentene.

Nulla (0/24, 0%) *mintaüregek közötti* átvitelre utaló álpozitív eredményt találtak. Mindegyik várt mutációt kimutatták. Nulla (0/24, 0%) *futtatások közötti* átvitelre utaló álpozitív eredményt találtak. Mindegyik várt mutációt kimutatták. Nulla (0/48, 0%) *összes (mintaüregek közötti és futtatások közötti) mintaátvitelre* utaló álpozitív eredményt találtak.

A csíravonal munkafolyamat teljesítményjellemezői

Az itt leírt vizsgálatokban a szekvenálási adatok elemzését a csíravonalbeli modullal végezték, kivéve azokat, amelyekben az egygénes panelhez vizsgálat-specifikus modult alkalmazták.

Pontosság

Az alábbi vizsgálatban az MiSeqDx készülék pontosságát mérték fel az MiSeqDx reagenskészlet v3 és kiváló minőségű DNS felhasználásával. A vizsgálat reprezentatív vizsgálati terve alapján 150 amplikon használatával több gén értékelése történt, amelyek összesen 12 588 bázist tartalmaznak 23 különböző kromoszómán. Az Y-kromoszóma nem tartalmaz konfidens területeket, ezért nem került értékelésre. Az ebben a vizsgálatban használt, egy család 12 tagjából (két szülő és 10 gyermek) származó öt mintát gyakran használják szekvenálási vizsgálatokhoz több laboratóriumban és többféle szekvenálási technológiával. Az alanyok közül öt nő és hét férfi. Mindegyik mintát kép példányban vizsgálták. Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a pontosan jellemzett referencia-adatbázissal. A referencia-adatbázisban található szekvencia (Platinum Genomes 2016-01 verzió) többféle szekvenálási módszer, nyilvánosan elérhető adatok és örökletes információk kombinációjából származik. A konfidens genomterületek meghatározása e referencia-módszerrel való összehasonlítással történt, ha nincs másképpen megadva. A mintákat összesen nyolcszor futtatták; a pontosságot bemutató táblázatok az első futtatás adatain alapulnak.

Az [1. 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-adatbázissal 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.

1. táblázat: Az MiSeqDx készülék bázisazonosítási eredményeinek egyezése mintánként

Minta	Átlagos azonosítási arány	Variánsok teljes száma	TP variánsok teljes száma	FN variánsok teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	TN azonosítások teljes száma	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100

Minta	Átlagos azonosítási arány	Variánsok teljes száma	TP variánsok teljes száma	FN variánsok teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	TN azonosítások teljes száma	PPA	NPA	OPA
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

A reprezentatív vizsgálat 150 amplikonból állt, amelyeket úgy terveztek, hogy lefedjenek többféle genomiális tartalmakat. Az amplikonok GC-tartalma 26–87% között volt. Az amplikonok tartalmaztak többféle, egy nukleotidot (például PolyA, PolyT), két nukleotidot és három nukleotidot tartalmazó ismétlődést is. Az adatok amplikononként vannak összesítve (2. táblázat), hogy meghatározzuk a genom tartalmának hatását a helyes azonosítások százalékos arányára. A helyes azonosítások százalékos aránya a variáns- és referenciaazonosításokat tartalmazza, és hibás vagy sikertelen azonosítás esetén kisebb mint 100%. Sikertelen az azonosítás, ha a variáns azonosítására vonatkozó egy vagy több szűrő feltételei nem teljesülnek (például nem elegendő lefedettség esetén).

A 2. táblázatban szereplő nyolc FN variáns közül hét a 111-es amplikonon található 1 bp inzerció esetén történt; ez az amplikon PolyA homopolimert is tartalmaz, és GC-tartalma 0,29. A maradék 1 FN (helytelen azonosítás) a 0,68 GC-tartalmú 125-ös amplikonon a várt heterozigóta SNV helyett homozigóta variáns azonosítása volt. Az SNV variáns gyakorisága 0,71 volt, ami magasabb a homozigóta variánsnak minősítéshez szükséges 0,70-es határértéknél. A legalacsonyabb helyes azonosítási arányú (98,2%) amplikon a 17. amplikon volt, amelyenél 40 sikertelen azonosítás történt; ez az amplikon AT-ismétlődéseket tartalmaz, és GC-tartalma 27%.

2. táblázat: Az MiSeqDx készülék amplikonszintű pontossága

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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	NA	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	NA	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	NA	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	NA	0,29	1872	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgáit fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC- tartalom	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	NA	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	NA	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	NA	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	NA	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	NA	0,42	1992	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	NA	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	NA	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	NA	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	NA	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	NA	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	NA	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	NA	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgáit fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	NA	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	NA	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	NA	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	NA	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	NA	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (2 db.)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	NA	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	NA	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	NA	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	NA	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	NA	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	NA	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	NA	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	NA	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	NA	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	NA	0,55	0	0	0	NA
149	Y	2655519	2655609	91	0	NA	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	NA

A sikertelen azonosítást okozó variánsok összefoglalása a [3. táblázatban](#) található. Az azonosítás sikertelenségét okozó szűrők a táblázatban szerepelnek. A 111-es amplikonban található inzerció a 16-ból kilenc esetben kiszűrést okozott, hét esetben pedig referenciaként azonosították, ami álnegatív eredmény.

3. táblázat: A sikertelen azonosítást okozó variánsok összegzése

Amplikon száma	Kromoszóma:Pozíció	Variáns	Az amplikon tartalma	Szűrő	Sikertelen azonosítást okozó variánsok száma	Várt variánsok száma	Álnegatív azonosítások száma
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R5x9 ¹	10	10	0

Amplikon száma	Kromoszóma:Pozíció	Variáns	Az amplikon tartalma	Szűrő	Sikertelen azonosítást okozó variánsok száma	Várt variánsok száma	Álnegatív azonosítások száma
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Ismétlődési szűrő. A variáns kiszűrése történik, ha a variáns vagy annak egy része ismételten jelen van a referenciagenomban a variáns pozíciója mellett. A referenciagenomban legalább kilenc ismétlődés szükséges, és csak legfeljebb 5 bp hosszúságú ismétlésekre vonatkozik.

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. Ismétlésenként 10 000 koordináta adatait határozták meg összehasonlítás céljából. A nem variáns bázisazonosításokat a humán genom 19. számú referenciaszekvenciájával hasonlították össze. A pontossági eredmények a [4. táblázatban](#) láthatók.

4. táblázat: Az NA12878 minta MiSeqDx készülékkel végzett bázisazonosítási eredményeinek egyezése az NIST adatbázissal

Minta	Amplikonok száma	Átlagos azonosítási arány	TP variánsok teljes száma	FN variánsok teljes száma	TN azonosítások teljes száma	FP azonosítások teljes száma	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

A mintákat tovább elemezték a kis inzerciók és deléciók (indelek) azonosítása céljából ([5. táblázat](#)). Néhány esetben az indel két vagy több mintában is előfordult, amint az indelt tartalmazó minták teljes száma oszlopban látható. A 12 érvényes minta mindkét ismétlésének eredményeit az [5. táblázat](#) tartalmazza. Összesen 71 olyan indelt találtak, amelyek mérete az inzerciók esetében 1–24 bp, illetve a deléciók esetében 1–25 bp volt. Ebből 69 indel kimutatása 100%-os pozitív százalékos egyezéssel történt. Egy deléció (64-es amplikon; 2 bp méretű deléció (chr10 55892600 TAC>T) esetében nem történt helyes azonosítás, mert mindegyik variáns az R5x9 szűrő miatt sikertelen azonosítást eredményezett. Ezért nem lehetett kiszámítani a PPA-t, amely nem tartalmazza a sikertelen azonosításokat. Egy további indel, 1 bp méretű inzerció (111-es amplikon, chr17 39589692 C>CA), esetében nem történt helyes azonosítás, mert kilenc variáns az R5x9 szűrő miatt sikertelen azonosítást eredményezett, és hét azonosítás álnegatív eredményt adott.

5. táblázat: Összefoglalás: indelek kimutatása az MiseqDx készülékkel

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hossza	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
1	1	36450544	93	25 bp méretű deléción	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp méretű deléción	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp méretű inzerción	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp méretű deléción	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp méretű inzerción	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp méretű inzerción	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp méretű inzerción	T>TTTGATA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 bp méretű deléción	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp méretű inzerción	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp méretű inzerción	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp méretű inzerción	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp méretű deléción	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp méretű inzerción	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp méretű deléción	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp méretű deléción	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hossza	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
27	4	164446785	62	11 bp méretű inzerció	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp méretű deléció	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp méretű inzerció	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp méretű deléció	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp méretű deléció	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp méretű deléció	CTTTCACTTTCCCGTCTCATGCAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp méretű deléció	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp méretű inzerció	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp méretű deléció	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp méretű inzerció	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp méretű deléció	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp méretű deléció	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp méretű deléció	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp méretű inzerció	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp méretű inzerció	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp méretű deléció	TCTGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
59	10	5987158	79	3 bp méretű deléció	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp méretű deléció	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp méretű deléció	TAC>T	10	10	0	0	NA
68	11	30177690	70	2 bp méretű inzerció	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp méretű inzerció	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp méretű deléció	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp méretű deléció	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp méretű inzerció	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp méretű inzerció	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp méretű inzerció	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp méretű deléció	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp méretű deléció	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp méretű inzerció	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp méretű deléció	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp méretű deléció	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp méretű deléció	CAAAT>C	12	0	0	12	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hossza	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
96	15	77879862	95	25 bp méretű deléció	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp méretű inzerció	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp méretű inzerció	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp méretű deléció	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp méretű deléció	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp méretű inzerció	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp méretű inzerció	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp méretű inzerció	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp méretű inzerció	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp méretű deléció	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp méretű deléció	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp méretű inzerció	T>TGTATCTTAGCAAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp méretű inzerció	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp méretű deléció	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp méretű deléció	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp méretű inzerció	A>AGTGGG	20	0	0	20	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
132	20	50897361	67	11 bp méretű inzerció	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp méretű deléció	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp méretű inzerció	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp méretű deléció	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp méretű deléció	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp méretű inzerció	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp méretű inzerció	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp méretű deléció	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Reprodukálhatóság

Két vizsgálatot végeztek az MiSeqDx készülékkel kapott eredmények reprodukálhatóságának értékelésére sejtvonalakkal (1. és 2. vizsgálat), illetve sejtvonalakkal kiegészített leukocitamentes vérrel (2. vizsgálat). Az 1. vizsgálatot több készülékkel végezték. A 2. vizsgálatot több helyszínen végezték.

1. vizsgálat

Az MiSeqDx készülék eredményeinek reprodukálhatóságát két készülék, két kezelő és két reagenstétel segítségével határozták meg, összesen nyolc futtatás során. A reprezentatív vizsgálat, a minták és a referencia-módszer megegyezik a pontossági vizsgálatnál leírtakkal.

Az eredmények amplikononkénti bontásban kerülnek bemutatásra az egyes készülékek esetében (6. táblázat), hogy bemutatható legyen az azonosítások reprodukálhatósága az egyes készülékek között. A helyes azonosítások %-os arányához figyelembe vannak véve a hibás és a sikertelen azonosítások (amikor egy vagy több szűrő nem teljesül) is. A készülékeken az adott amplikontól függően hasonló számú sikertelen és helytelen azonosítás történt.

6. táblázat: Az MiSeqDx készülékek közötti reprodukálhatósági eredményei (amplikonszintű)

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC- tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	NA	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	NA	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	NA	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	NA	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	NA	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	NA	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	NA	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	NA	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	NA	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	NA	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	NA	0,49	7680	0	0	7680	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
66	10	118351373	118351453	81	81	NA	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	NA	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	NA	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	NA	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	NA	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	NA	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	NA	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	NA	0,25	7968	0	0	7968	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC- tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	NA	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	NA	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (2 db.)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	NA	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	NA	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	NA	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	NA	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	NA	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	NA	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Amplikon kezdetének helye	Amplikon végének helye	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	NA	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	NA	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	NA	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	NA	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	NA	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

A reprodukálhatósági vizsgálat eredményeit kezelőnként elemezték a variánsok gyakorisága alapján (7. táblázat). Ez az elemzés azt mutatta, hogy a variánsok gyakorisága konzisztens volt a kezelők között. A variánsok átlagos gyakorisága +/- 1 szórással szerepel.

7. táblázat: Kezelők közötti eredmények az MiseqDx készülékre vonatkozóan

Variáns gyakorisági tartománya	Egyedi variánsok száma	Az 1. kezelő által elemzett variánsok teljes száma	A 2. kezelő által elemzett variánsok teljes száma	Az 1. kezelő által jelentett variánsgyakoriság átlaga (szórás)	A 2. kezelő által jelentett variánsgyakoriság átlaga (szórás)
Homozigóta (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozigóta (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Az egyes minták reprodukálhatósági vizsgálatának eredményei mind a nyolc futtatás összevont adatait tartalmazzák (8. táblázat). A kimutatást külön értékelték az egyes variánstípusok (SNV-k, inzerciók és deléciók) esetében. A referenciapozíciók nem szerepelnek az elemzésben. Ez az elemzés azt mutatta, hogy a variánsokra vonatkozó eredmények reprodukálhatók az egyes minták között.

8. táblázat: Az MiSeqDx készülék bázisazonosítási eredményeinek egyezése az egyes mintáknál

Minta	Összesen	SNV-k			Inzerciók			Deléciók				
		TP-k teljes száma	Helytelen eredmények teljes száma	Helytelen eredmények teljes száma	Helytelen eredmények teljes száma	TP-k teljes száma	FP-k teljes száma	FN-ek teljes száma	Összesen	TP-k teljes száma	FP-k teljes száma	FN-ek teljes száma
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	0	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	0
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Az ebben a reprodukálhatósági vizsgálatban szereplő nyolc futtatás adatai alátámasztják, hogy az MiSeqDx készülék konzisztens szekvenálást tud végezni az alábbi feltételek teljesülése esetén:

- A GC-tartalom $\geq 19\%$ (sikeres azonosítás esetén a 19%-os GC-tartalmú 192 szekvenált amplikonból 192 esetben minden bázisazonosítás helyes, a azonosítás sikertelenségének aránya 1,1%)
- A GC-tartalom $\leq 78\%$ (sikeres azonosítás esetén a 78%-os GC-tartalmú 192 szekvenált amplikonból 192 esetben minden bázisazonosítás helyes, nincs sikertelen azonosítás)
- PolyA hosszúsága ≤ 8 (PolyA = 8 esetében a 192 szekvenált amplikonból 192 esetben helyes a 8 nukleotidból álló PolyA ismétlődés azonosítása)
- PolyT hosszúsága ≤ 10 (PolyT = 10 esetében a 192 szekvenált amplikonból 192 esetben helyes a 10 nukleotidból álló PolyT ismétlődés azonosítása)
- PolyG hosszúsága ≤ 7 (PolyG = 7 esetében a 192 szekvenált amplikonból 192 esetben helyes a 7 nukleotidból álló PolyG ismétlődés azonosítása)
- PolyC hosszúsága ≤ 6 (PolyC = 6 esetében a 576 szekvenált amplikonból 576 esetben helyes a 6 nukleotidból álló PolyC ismétlődés azonosítása)
- A két nukleotid ismétlődésének hosszúsága ≤ 11 ismétlődés (a két nukleotid 11-szeres ismétlődését tartalmazó 192 szekvenált amplikonból 192 azonosítás eredménye helyes, az azonosítás sikertelenségének aránya 0,5%)
- A három nukleotid ismétlődésének hosszúsága ≤ 5 ismétlődés (a három nukleotid 5-szörös ismétlődését tartalmazó 192 szekvenált amplikonból 192 azonosítás eredménye helyes, az azonosítás sikertelenségének aránya 0,5%)
- Legfeljebb 24 bázis hosszúságú inzerció és legfeljebb 25 bázis hosszúságú deléció
 - A 24 bázis hosszúságú inzerciót tartalmazó 192 mintából 192 azonosítási eredménye helyes
 - A 25 bázis hosszúságú inzerciót tartalmazó 224 mintából 223 azonosítási eredménye helyes, és 1 esetben helytelen az azonosítás

2. vizsgálat

Egy reprezentatív teszttel, az Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay vizsgálatával végzett helyszínek közötti reprodukálhatósági vizsgálat a *CFTR* klinikailag jelentős genetikai variációinak egy részhalmazát tartalmazta, amelyet az MiSeq Reporter szoftverrel és az MiSeqDx Platform célzott DNS-szekvenálási munkafolyamatával elemeztek. A vak vizsgálatot 3 helyszínen mindegyikén 2-2 kezelő végezte. Minden helyszínen két jól jellemzett, egyenként 46 mintából álló panelt vizsgált mindkét kezelő, ami

helyszínenként összesen 810 azonosítást jelentett. A panelek a *CFTR* gén ismert variánsait hordozó sejtvonalakból származó genomikus DNS-ek keverékét, valamint a *CFTR* gén ismert variánsaival rendelkező sejtvonallal kiegészített, leukocitamentes vért tartalmaztak. Azért használtak vérmintákat, hogy értékelni lehessen a vizsgálati munkafolyamat elsődleges bemeneteként szolgáló gDNS előállításához használt extrakciós lépéseket. A minták sikerességi aránya, vagyis az első próbálkozás alkalmával megfelelő minőség-ellenőrzési mérőszámokat adó minták arány 99,88% volt. Minden vizsgálati eredmény az első tesztelés eredményein alapul.

9. táblázat: A reprezentatív MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay vizsgálattal végzett reprodukálhatósági vizsgálat eredményeinek összefoglalása

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes száma helyszínenként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások	Sikertelen azonosítások	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes száma helyszínenként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások	Sikertelen azonosítások	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín					
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nincs jelen	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes száma helyszínenként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások	Sikertelen azonosítások	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín					
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes száma helyszínenként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások	Sikertelen azonosítások	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín					
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes száma helyszínenként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások	Sikertelen azonosítások	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín					
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	NA	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes száma helyszínenként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások	Sikertelen azonosítások	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín	helyszín					
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Összes				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Az N1303K variánsnak megfelelő vad típusú hely egy replikátum esetében nem megfelelő lefedettség miatt sikertelen azonosítást eredményezett.

² Az 5. és a 75. minta egy ismétlése alkalmával 0% volt az azonosítási arány. További vizsgálatok azt mutatják, hogy a mintákat nem adták hozzá a mintalemezhez a könyvtárkészítés előtt, ugyanis a csövekben maradt mintamennyiségek arra utaltak, hogy nem távolították el a belőlük a minta mennyiségét.

³ A bizonyítékok arra utalnak, hogy a 9. és 10. mintát valószínűleg felcserélte a kezelő a könyvtárkészítés előtt.

⁴ Az M1V variánsnak megfelelő vad típusú hely két minta egy-egy replikátuma esetében nem megfelelő lefedettség miatt sikertelen azonosítást eredményezett.

A szomatikus munkafolyamat teljesítményjellemzői

Az itt leírt vizsgálatokban a szekvenálási adatok elemzését a szomatikus modullal végezték, kivéve azokat, amelyekben a kétféles panelhez vizsgálat-specifikus modult alkalmazták.

Pontosság

Három vizsgálatot végeztek az MiSeqDx készülék pontosságának értékelésére FFPE-mintákból kivont DNS-sel.

1. vizsgálat

A vizsgálat reprezentatív vizsgálati terve alapján 150 amplicon használatával több gén értékelése történt, amelyek összesen 12 588 bázist tartalmaznak 23 különböző kromoszómán. Az Y-kromoszóma nem tartalmaz konfidens területeket, ezért nem került értékelésre. Az ebben a vizsgálatban használt, egy család öt tagjából (két szülő és három gyermek) származó öt mintát gyakran használják szekvenálási vizsgálatokhoz több laboratóriumban és többféle szekvenálási technológiával. Az alanyok közül három nő és

kettő férfi. Minden mintát formalinnal fixáltak, és paraffinba ágyaztak, mielőtt kivonták a DNS-t a vizsgálatához. A GM12877 mintát DNS-szinten hígították a GM12878 mintával, létrehozva a GM12877-D mintát, amely 5%-os, illetve 10%-os gyakorisággal tartalmazott bizonyos variánsokat. Minden mintát két példányban vizsgálták, kivéve a GM12877-D mintát, amelyet öt példányban vizsgáltak. Az SNV-k, inzerciók és deléciók kimutatásának pontossága meghatározásához a kapott eredményeket összehasonlították a pontosan jellemzett referencia-adatbázissal. A referencia-adatbázisban található szekvencia (Platinum Genomes 2016-01 verzió) többféle szekvenálási módszer, nyilvánosan elérhető adatok és örökletes információk kombinációjából származik. A konfidens genomterületek meghatározása e referencia-módszerrel való összehasonlítással történt, ha nincs másképpen megadva. A mintákat összesen nyolcszor futtatták. A pontosságot bemutató táblázatok az első futtatás adatain alapulnak.

A **10. 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-adatbázissal 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.

10. táblázat: Az MiSeqDx készülék bázisazonosítási eredményeinek egyezése a referenciaadatokkal 6 jól jellemzett minta esetében

Minta	Átlagos azonosítási arány	Variánsok teljes száma	TP variánsok teljes száma	FN variánsok teljes száma	TN azonosítások teljes száma	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D ¹		675	650	0		100	100	100
GM12877-D ²	98,4	155	155	0	57608	100	100	100

¹ Több mint 20%-os gyakoriságú variánsok.

² Kevesebb mint 20%-os gyakoriságú variánsok.

A 150 amplikont úgy terveztek, hogy lefedjenek sokféle genomiális tartalmakat. Az amplikonok GC-tartalma 26–87% között volt. Az amplikonok tartalmaztak többféle, egy nukleotidot (például PolyA, PolyT), két nukleotidot és három nukleotidot tartalmazó ismétlődést is. 6 egyedi mintát alkalmaztak a vizsgálatban. Az adatok amplikononként vannak összesítve (**11. táblázat**), hogy meghatározzuk a genom tartalmának hatását a helyes azonosítások százalékos arányára. A helyes azonosítások százalékos aránya a variáns- és referenciaazonosításokat tartalmazza, és hibás vagy sikertelen azonosítás esetén kisebb mint 100%. Sikertelen az azonosítás, ha a variáns azonosítására vonatkozó egy vagy több szűrő feltételei nem teljesülnek (például nem elegendő lefedettség

esetén). Nem fordult elő helytelen azonosítás. A sikertelen azonosítások száma jelentős mértékben különbözött az egyes amplikonokban. A GC-tartalom és a GC-tartalommal való többféle kölcsönhatás volt a sikertelen azonosítás legjelentősebb előrejelzője. A 2580 sikertelen azonosításból 2040 (79%) esetében az volt az oka, hogy nem feleltek meg a lefedettségi előírásnak. A 78%-nál nagyobb GC-tartalmú amplikonoknál fordult elő a legtöbb sikertelen azonosítás. Egy 78%-os GC-tartalmú reprezentatív amplikon esetében 675 sikertelen azonosítás fordult elő. Egy 87%-os GC-tartalmú reprezentatív amplikon esetében 1365 sikertelen azonosítás fordult elő. A lefedettség növelhető az áramlási cellába töltött minták számának csökkentésével, ez lehetővé teszi a magas GC-tartalmú amplikonok kimutatását.

11. táblázat: Amplikonszintű pontossági adatok

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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	NA	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	NA	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	NA	0,43	1245	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	NA	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	NA	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	NA	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	NA	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	NA	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	NA	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	NA	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	NA	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	NA	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	NA	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	NA	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	NA	0,59	1530	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	NA	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	NA	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	NA	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	NA	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
99	15	89817413	89817503	91	91	NA	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	NA	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (2 db.)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	NA	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	00,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	NA	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	NA	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	NA	0,68	1110	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 teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások százalékos aránya
126	19	18186574	18186643	70	70	NA	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	NA	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	NA	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	NA	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	NA	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	NA	0,55	0	0	0	NA
149	Y	2655519	2655609	91	0	NA	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	NA

A sikertelen azonosítást okozó variánsok összefoglalása a [12. táblázatban](#) található. Az azonosítás sikertelenségét okozó szűrők a táblázatban szerepelnek.

12. táblázat: A sikertelen azonosítást okozó variánsok összegzése

Amplikon száma	Kromoszóma: Pozíció	Variáns	Az amplikon tartalma	Szűrő	Sikertelen azonosítást okozó variánsok száma	Várt variánsok száma
28	5:1882129	T > G	78% GC	LowDP ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61% GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87% GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R3x6	13	13

¹ LowDP: alacsony lefedettség. Egy variáns kiszűrésre kerül, ha legalább egyik pool szekvenálási mélysége az illető pozícióban 900-nál alacsonyabb.

² R3x6: Ismétlődési szűrő. A variáns kiszűrése történik, ha a variáns vagy annak egy része ismételten jelen van a referenciagenomban a variáns pozíciója mellett. A referenciagenomban legalább hat ismétlődés szükséges, és csak legfeljebb 3 bp hosszúságú ismétlésekre vonatkozik.

A 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. Ismétlésenként 10 000 koordináta adatait határozták meg összehasonlítás céljából. A nem variáns bázisazonosításokat a humán genom hg19-es referenciaszekvenciájával hasonlították össze. A pontossági eredmények a [13. táblázatban](#) láthatók.

13. táblázat: Az MiSeqDx készülékkel végzett bázisazonosítási eredmények egyezése a NIST referencia-adatbázisában szereplő NA12878 mintával

Minta	Amplikonok száma	Átlagos azonosítási arány	TP variánsazonosítások teljes száma	FN variánsazonosítások teljes száma	TN azonosítások teljes száma	FP azonosítások teljes száma	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Az öt hígítatlan mintát tovább elemezték a kis inzerciók és deléciók (indelek) azonosítása céljából ([14. táblázat](#)). Néhány esetben az indel két vagy több mintában is előfordult, amint az indelt tartalmazó minták teljes száma oszlopban látható. Az öt minta mindkét ismétlésének eredményeit a [14. táblázat](#) tartalmazza. Összesen 71 olyan indelt találtak, amelyek mérete az inzerciók esetében 1–24 bp, illetve a deléciók esetében 1–25 bp volt. Ebből 68 indel kimutatásának pozitív százalékos egyezése 1 volt. Három inzerció és deléció esetében nem történt helyes azonosítás, mert mindegyik variáns az R3x6 szűrő miatt sikertelen azonosítást eredményezett. Ezért nem lehetett kiszámítani a PPA-t, amely nem tartalmazza a sikertelen azonosításokat. E három variáns: 1 bp deléció (chr8 24811064 AG>A) 2 bp deléció (chr10 55892600 TAC>T), illetve 1 bp inzerció (chr17 39589692 C>CA).

14. táblázat: Összefoglalás: indelek kimutatása az MiseqDx készülékkel

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
1	1	36450544	93	25 bp méretű deléció	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp méretű deléció	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp méretű inzerció	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp méretű deléció	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp méretű inzerció	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp méretű inzerció	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp méretű inzerció	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp méretű deléció	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp méretű inzerció	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp méretű inzerció	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 bp méretű inzerció	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp méretű deléció	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp méretű inzerció	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp méretű deléció	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp méretű deléció	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp méretű inzerció	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
31	5	74077155	83	4 bp méretű deléció	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp méretű inzerció	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp méretű deléció	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp méretű deléció	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp méretű deléció	CTTTCACTTTCCCCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp méretű deléció	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp méretű inzerció	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp méretű deléció	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp méretű inzerció	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp méretű deléció	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp méretű deléció	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp méretű deléció	AG>A	15	15	0	0	NA
53	8	76518677	67	4 bp méretű inzerció	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp méretű inzerció	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp méretű deléció	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp méretű deléció	TAAC>T	11	0	0	11	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
63	10	45084202	95	16 bp méretű deléció	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp méretű deléció	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp méretű inzerció	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp méretű inzerció	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp méretű deléció	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp méretű deléció	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp méretű inzerció	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp méretű inzerció	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp méretű inzerció	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp méretű deléció	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp méretű deléció	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp méretű inzerció	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp méretű deléció	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp méretű deléció	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp méretű deléció	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp méretű deléció	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
98	15	85438311	72	3 bp méretű inzerció	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp méretű inzerció	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp méretű deléció	ATTATTTT>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp méretű deléció	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp méretű inzerció	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp méretű inzerció	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp méretű inzerció	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp méretű inzerció	T>TTCTGAAGGTC AAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp méretű deléció	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp méretű deléció	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp méretű inzerció	T>TGTATCTTAGCAAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp méretű inzerció	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp méretű deléció	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp méretű deléció	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp méretű inzerció	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp méretű inzerció	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp méretű deléció	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100

Amplikon	Kromoszóma	Elhelyezkedés	Vizsgált fragmentum mérete	Amplikont érintő indel típusa és hosszúsága	Indel	Az indelt tartalmazó minták teljes száma	Sikertelen azonosítások száma	Indel helytelen azonosításainak teljes száma	Indel helyes azonosításainak teljes száma	PPA
135	21	30300873	66	11 bp méretű inzerció	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp méretű deléció	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp méretű deléció	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp méretű inzerció	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp méretű inzerció	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp méretű deléció	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

2. vizsgálat

Ebben a vizsgálatban szövetbankból származó FFPE colorectalis daganatból származó szövetmintáknál egy reprezentatív kétgénes vizsgálatot hasonlítottak össze a referencia-módszerrel, a kétirányú Sanger-szekvenálással (Sanger). Az összesen 1183 alany közül 441 esetben voltak érvényes Sanger- és reprezentatív vizsgálati eredmények. Az alanyok szintjén értékelve (15. táblázat), a 441 vizsgálati alanyból 230 volt pozitív Sanger-szekvenálással (Sanger-szekvenálással kimutatott mutáció). Közülük 227 esetben volt pozitív a reprezentatív vizsgálat eredménye. A 441 vizsgálati alanyból 211 volt negatív Sanger-szekvenálással (Sanger-szekvenálással nem mutatható ki mutáció). Közülük 206 esetben volt negatív a reprezentatív vizsgálat eredménye. Ez 98,7%-os pozitív százalékos egyezést (PPA) és 97,6%-os negatív százalékos egyezést (NPA) jelent (15. táblázat).

15. táblázat: Az alanyok szintjén kapott eredmények pozitív és negatív százalékos egyezése

Reprezentatív vizsgálat	Sanger-szekvenálás		Összes
	Pozitív	Negatív	
Pozitív	227 ¹	5	232
Negatív	3 ²	206	209
Összes	230	211	441

A teljesítmény összegzése		
Egyezés típusa	Becsült érték	Pontos 95%-os konfidenciaintervallum
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%, 99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%, 99,2%]

¹Pontosan megegyezett az eredmény minden mutációra vonatkozóan 224 alany esetében. Két alanynál az MiSeqDx rendszer kimutatta a Sanger-szekvenálással azonosított mutációt és egy további mutációt. Egy alany esetében az MiSeqDx rendszer és a Sanger-szekvenálás különböző mutációkat mutatott ki.

²Egy alanynál a Sanger-szekvenálás két mutációt mutatott ki. Két alanynál a Sanger-szekvenálás egy mutációt mutatott ki.

3. vizsgálat

Ebben a vizsgálatban az FFPE-mintákból készített DNS-könyvtárakat vizsgálták több szövettípus esetében. Nyolc különböző szövetből (vastagbél, petefészek, hasnyálmirigy, mellékvese, húgyhólyag, máj, pajzsmirigy és emlő) származó, szövettípusonként legalább 11, összesen 109 FFPE-minta vizsgálata történt. A mellékveseszövetben nyelőcső-, tüdő- és vastagbél daganatokból származó áttétek voltak. A többi szövet primer tumort tartalmazott. Ez a vizsgálat reprezentatív vizsgálati terve alapján 26 gén értékelése történt, amelyek összesen 21 577 bázist tartalmaznak 17 különböző kromozómán. Összesen hat különböző gént (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* és *BRAF*) szekvenáltak Sanger-szekvenálással; minden daganat esetében 1–3 gént szekvenáltak Sanger-szekvenálással az adott daganat szomatikus mutációinak várható gyakorisága alapján. A Sanger-szekvenálással 39 SNV szomatikus mutációt azonosítottak 109 FFPE-minta közül 33-ban. Az MiSeqDx 36 SNV szomatikus mutációt azonosított 109 FFPE-minta közül 32-ben, egy álnegatív eredménnyel és két, a variáns pozíciókat érintő sikertelen azonosítással. A PPA értéke 97,3% volt. Az MiSeqDx 78 975 referenciabázist azonosított a 109 FFPE-minta esetében, a Sanger-szekvenáláshoz képest 29 álpozitív eredménnyel és 2437 sikertelen azonosítással. Az NPA értéke 99,9% volt. Egy két bázist érintő deléciót mindkét módszerrel egybehangzóan mutattak ki. A [16. táblázat](#) tartalmazza az eredményeket szövettípus szerint.

16. táblázat: Pozitív és negatív százalékos egyezés szövettípusonként

Szövettípus	Minták száma	Variánsok teljes száma	TP variánsok teljes száma	FN variánsok teljes száma	TN azonosítások teljes száma	FP azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	PPA	NPA
Mellékvese	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
Húgyhólyag	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Emlő	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Vastagbél	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Máj	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Petefészek	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Hasnyálmirigy	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Pajzsmirigy	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Összes	109	39	36	1	78974	29	3416	97,3	>99,9

Reprodukálhatóság

Két vizsgálatot végeztek az MiSeqDx készülék eredményei reprodukálhatóságának értékelésére FFPE-mintákból kivont DNS-sel. Az 1. vizsgálatot több készülékkel végezték. A 2. vizsgálatot több helyszínen végezték.

1. vizsgálat

Az MiseqDx készülék eredményeinek reprodukálhatóságát két készülék és két képzett kezelő segítségével határozták meg, összesen nyolc futtatás során. A reprezentatív vizsgálat, az amplikonok genomikus tartalma, a minták és a referencia-módszer megegyezik a fenti 1. pontossági vizsgálatnál leírtakkal. Az eredmények amplikonkénti bontásban kerülnek bemutatásra az egyes készülékek esetében (17. táblázat), hogy bemutatható legyen az azonosítások reprodukálhatósága az egyes készülékek között. A helyes azonosítások %-os arányához figyelembe vannak véve a hibás és a sikertelen azonosítások (amikor egy vagy több szűrő nem teljesül) is. A készülékeken az adott amplikontól függően hasonló számú sikertelen azonosítás történt. Az MiSeqDx 1 esetében egyetlen hibás azonosítást figyeltek meg a Platinum Genomes referenciastandard által meghatározott megbízható régióban. A hibás azonosítás egy inzerációs variáns álpozitív azonosítása volt a 10. kromoszómát lekérdező 64-es amplikonban az 55892599 és 55892687 közötti pozíciókban. Az amplikonban 11-szeres dinukleotid-ismétlődés fordult elő.

17. táblázat: Az MiSeqDx készülékek közötti reprodukálhatósági eredményei (amplikonszintű)

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10) indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	NA	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az ampliconban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	NA	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	NA	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	NA	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	NA	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	NA	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	NA	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	NA	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	NA	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	NA	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	NA	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	NA	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	NA	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	NA	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	NA	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	NA	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	NA	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az ampliconban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
83	13	73	73	NA	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	NA	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	NA	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	NA	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	NA	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	NA	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	NA	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	NA	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	NA	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	NA	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0

Amplikon	Kromoszóma	Vizsgált fragmentum mérete	Konfidens területeken található bázisok száma	Az amplikonban található genomikus tartalom	GC-tartalom	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma	Helyes azonosítások teljes száma	Helytelen azonosítások teljes száma	Sikertelen azonosítások teljes száma
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	NA	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	NA	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	NA	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	NA	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	NA	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

A reprodukálhatósági vizsgálat eredményeit kezelőnként elemezték a variánsok gyakorisága alapján (18. táblázat). Ez az elemzés azt mutatta, hogy a variánsok gyakorisága konzisztens volt a kezelők között. A variánsok átlagos gyakorisága +/- 1 szórással szerepel.

18. táblázat: Kezelők közötti eredmények az MiSeqDx készülékre vonatkozóan

Variáns gyakorisági tartománya	Egyedi variánsok száma	Az 1. kezelő által elemzett variánsok teljes száma	A 2. kezelő által elemzett variánsok teljes száma	Az 1. kezelő által jelentett variáns gyakoriság átlaga (szórás)	A 2. kezelő által jelentett variáns gyakoriság átlaga (szórás)
Nagy gyakoriság (~100%)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Közepes gyakoriság (~50%)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Alacsony gyakoriság (3–7%)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Az egyes minták reprodukálhatósági vizsgálatának eredményei mind a nyolc futtatás összevont adatait tartalmazzák (19. táblázat). A kimutatást külön értékelték az egyes variánstípusok (SNV-k, inzerciók és deléciók) esetében. A referencia részét képező pozíciók nem szerepelnek az elemzésben. Ez az elemzés azt mutatta, hogy a variánsokra vonatkozó eredmények reprodukálhatók az egyes minták között.

19. táblázat: Az MiSeqDx készülék bázisazonosítási eredményeinek egyezése az egyes mintáknál

Minta	SNV-k			Inzerciók			Deléciók					
	Összesen	TP-k teljes száma	FP-k teljes száma	FN-ek teljes száma	Összesen	TP-k teljes száma	FP-k teljes száma	FN-ek teljes száma	Összesen	TP-k teljes száma	FP-k teljes száma	FN-ek teljes száma
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹Több mint 20%-os gyakoriságú variánsok.

²Kevesebb mint 20%-os gyakoriságú variánsok.

Az ebben a reprodukálhatósági vizsgálatban szereplő 8 futtatás adatai alátámasztják, hogy az MiSeqDx készülék konzisztens szekvenálást tud végezni az alábbi feltételek teljesülése esetén:

- A GC-tartalom $\geq 19\%$ (sikeres azonosítás esetén a 19%-os GC-tartalmú 120 szekvenált amplikonból 120 esetben minden bázisazonosítás helyes, a azonosítás sikertelenségének aránya 3,4%)
- A GC-tartalom $\leq 73\%$ (sikeres azonosítás esetén a 73%-os GC-tartalmú 120 szekvenált amplikonból 120 esetben minden bázisazonosítás helyes, a azonosítás sikertelenségének aránya 0,1%)
- PolyA hosszúsága ≤ 8 (PolyA = 8 esetében a 120 szekvenált amplikonból 120 esetben helyes a 8 nukleotidból álló PolyA ismétlődés azonosítása)
- PolyT hosszúsága ≤ 10 (PolyT = 10 esetében a 120 szekvenált amplikonból 120 esetben helyes a 10 nukleotidból álló PolyT ismétlődés azonosítása)

- PolyG hosszúsága ≤ 6 (PolyG = 6 esetében a 720 szekvenált amplikonból 720 esetben helyes a 6 nukleotidból álló PolyG ismétlődés azonosítása)
- PolyC hosszúsága ≤ 6 (PolyC = 6 esetében a 360 szekvenált amplikonból 359 esetben helyes a 6 nukleotidból álló PolyC ismétlődés azonosítása, 1 esetben sikertelen az azonosítás)
- A két nukleotid ismétlődésének hosszúsága ≤ 4 ismétlődés (a két nukleotid 4-szeres ismétlődését tartalmazó 600 szekvenált amplikonból 600 azonosítás eredménye helyes, az azonosítás sikertelenségének aránya 0,4%)
- A három nukleotid ismétlődésének hosszúsága ≤ 5 ismétlődés (a három nukleotid 5-szörös ismétlődését tartalmazó 120 szekvenált amplikonból 120 azonosítás eredménye helyes, az azonosítás sikertelenségének aránya 1,9%)
- Legfeljebb 24 bázis hosszúságú inzerció és legfeljebb 25 bázis hosszúságú delécio
 - A 24 bázis hosszúságú inzerciót tartalmazó 120 mintából 120 azonosítási eredménye helyes
 - A 25 bázis hosszúságú inzerciót tartalmazó 184 mintából 182 azonosítási eredménye helyes, és 2 esetben sikertelen az azonosítás

2. vizsgálat

Külső vizsgálatot végeztek a 2. pontossági vizsgálatban leírt reprezentatív kétgénes vizsgálat reprodukálhatóságának értékelésére három külső vizsgálati helyszínen (helyszínenként két kezelő), egy reagenstétellel, három, nem egymást követő napon. A vizsgálatokat hat jól jellemzett, klinikai FFPE-mintákból vagy sejtvonalakból származó DNS-mintákat tartalmazó mintapaneleken végezték. Mindegyik panel 10 mintát tartalmazott, így összesen 60 mintát elemeztek.

A panelek 60 mintája közül négy különböző (a panel mutációi szempontjából) vad típusú minta, 12 különböző mutáns (egyetlen mutációval) mintából készített egy-egy magas és alacsony mutációs gyakoriságú minta, valamint két különböző mutáns (egyetlen mutációval), csak alacsony mutációs gyakoriságú minta duplikátumaiból állt. Minden egyes mintafajtájú és mutációs gyakoriságú minta (amelyeket minden futtatásban duplikátumban vizsgáltak) 36 lehetséges eredményt adott (2 ismétlés \times 2 operátor \times 3 nap \times 3 helyszín), ha minden eredmény érvényes volt.

Az összes pozitív és negatív variáns esetében a százalékos várható azonosítás (PEC) értékeléséhez a reprezentatív vizsgálati eredményt összehasonlították a várható mutációs eredménnyel (a várható mutációt kimutatták vagy nem mutatták ki) minden egyes mintában. A PEC értéke 100% szorozva a várható azonosítások számával, osztva a megkísérelt azonosítások számával. A kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallum számítása a Wilson-pontszám módszerrel történt.

A minta első futtatása és az első futtatáskor érvényes minták további futtatása során, az összes helyszínen kapott adatok alapján a minták érvényességi aránya $\geq 94,7\%$ volt. A mutációszintű PEC az összes mutáns mintában $99,6\%$ (905/909) volt (95% CI 98,9–99,8). Az 56 mutáns minta megkísérelt azonosításainak száma (függetlenül a mutáció várható kimutatásától) 58 856 (56 x 1051) volt. Az 58 856 mutációs szintű eredményből mindössze hat olyan eset volt, amikor a megfigyelt és a várt eredmények nem egyeztek meg. A mutációs szintű PEC a mutáns és a vad típusú minták összes pozitív és negatív variánsát tekintve együttesen $99,99\%$ (58 850/58 856) volt.

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

Ez a vizsgálat igazolta a vizsgálat határértékét, és meghatározta az MiSeqDx rendszer kimutatási határértékét (LoD) egy reprezentatív panel segítségével. Összefoglalva, a jól jellemzett GM12878 és GM12877 Platinum Genome sejtvonallal formalinos fixálása és paraffinba ágyazása után kivonták belőlük a DNS-t. A GM12878-at hígították a GM12877-gyel úgy, hogy hetven variáns (52 SNV, kilenc inzerció és kilenc deléción) esetében a variáns szekvenciák aránya közel $0,05$ volt. A két DNS-mintát két kezelő vizsgálta két készülékkel és két reagenstétel használatával, összesen 10 MiSeqDx szekvenálási futtatás során. Ez a GM12878 mindegyik variánsa esetén 40 ismétlést és a GM12877 mindegyik, a megfelelő koordináták vad típusa esetében 60 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 deléciónkra külön-külön számították ki az egyes variánstípusok variáns gyakoriságainak összevonásával. Az I. típusú hibát $0,01$ -os gyakoriságként, a II. típusú hibát pedig $0,05$ -os gyakoriságként határoztuk 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 ([20. táblázat](#)). Az MiSeqDx szoftver a variánsok minőségi kimutatásához határértékként a $0,026$ -os variánsfrekvenciát (az effektív LoB) használ. A kiszámított vak határértékek igazolták, hogy ez a határérték legfeljebb $0,01$ -es I. típusú hibát eredményez.

20. táblázat: Vak határérték

Variáns típusa	Variánsgyakoriságok teljes száma	LoB – 1. reagenstétel	LoB – 2. reagenstétel
SNV	3120	0,87	0,75
Inzerció	540	0,79	0,60
Deléció	540	0,96	0,84

Az LoD számításához meghatározták a 0,026 határérték alá eső minden egyes mutáció gyakoriságának százalékos értékét mindegyik reagenstétel és mindegyik variánstípus esetén (21. táblázat). Mivel a százalékos arányok alacsonyabbak voltak, mint a II. típusú hiba 5% (0,05) értéke, a kombinált variánsfrekvenciák mediánját számították ki LoD-ként (22. táblázat). Az egyes variánstípusok LoD-jét a két reagenstételre kapott két érték közül a nagyobbikként állapították meg: 5,45% az SNV-k esetében, 4,88% az inzerciók esetében és 5,44% a deléciók esetében.

21. táblázat: Kimutatási határérték

Reagenstétel	Variáns típusa	Variánsgyakoriságok teljes száma	< 2,6% eredményű VF-mérések száma	< 2,6% eredményű VF-mérések százalékos aránya	Kimutatási határérték (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Inzerció	360	0	0,00	4,86
	Deléció	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Inzerció	360	0	0,00	4,88
	Deléció	360	0	0,00	5,24

A következő vizsgálatok az MiSeqDx teljesítményjellemzőit mutatják be egy másik reprezentatív teszttel, amely két klinikailag releváns daganatgén 56 mutációjára irányul (mutációs panel). A mutációs panel két klinikailag releváns daganatgén (1. gén és 2. gén) 56 mutációját mutatja ki specifikusan. A vizsgálat minden szekvenált mintában mind az 56 mutáció jelenlétét vagy hiányát állapítja meg egyenként. E vizsgálatokhoz referencia-módszerként a kétirányú Sanger-módszer szolgált.

Tételek közötti precizitás

Tételenkénti precizitási vizsgálatot végeztek az MiseqDx készülék teljesítményének értékelésére az egyes reagenskészlet-tételek között (ezek a mintaminősítési, a könyvtárkészítési és a szekvenáló reagensekből állnak) a kétgénes reprezentatív vizsgálat segítségével, öt kevert FFPE-mintapanel felhasználásával, amelyek megfeleltek a mintaminősítési követelményeknek. Mindegyik FFPE-minta két egyedi mutációt tartalmazott: egy alacsonyabb (kb. 8%-os) és egy magas (kb. 14%-os) gyakoriságú mutációt. Mind az öt mintakeverékből tizenkét (12) megfigyelést gyűjtöttek három nem egymást követő napon, három reagenskészlet-tétellel. A vizsgálat összes megfigyelésének száma az összes reagenstételre vonatkozóan 180 megfigyelés volt az összes mintakeverékre és 360 megfigyelés az összes mutációs gyakorisági szintre vonatkozóan. Az összes tétellel, az összes napon végzett 360 megfigyelés közül 359 esetben (99,7%) mutatták ki a várt eredményt. Egy alkalommal a kisebb gyakoriságú mutációt vad típusúként azonosították. A rendszer varianciájának becslése érdekében varianciakomponens-elemzést végeztek minden egyes mutációra, illetve mutációs gyakorisági szintre. A teljes szórás 0,011–0,029 között alakult. A teljes szórásnak a reagenstétel által okozott komponense 0–0,015 között alakult.

Módosítási előzmények

Dokumentumszám	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 200006218 v01	2022. május	Az MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro terméktájékoztató hozzáadása a szükséges, de nem szállított eszközök és anyagok felsorolásához. Az MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro tesztelési információinak hozzáadása a Teljesítményjellemzők fejezetéhez. A csak az Amerikai Egyesült Államokra vonatkozó óvintézkedési megjegyzés eltávolítása a Figyelmeztetések és óvintézkedések fejezetből.
Dokumentumszám: 200006218 v00	2021. november	Első kiadás, az MOS v4.0 és a Local Run Manager v3.0 ismertetése.

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).

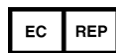
© 2022 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

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

Elérhetőségek



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (Észak-Amerikán kívül)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Termékcímke

A termék csomagolásán és címkéjén található szimbólumokkal kapcsolatos további információk az Ön készletére vonatkozóan a support.illumina.com weboldalon, a Szimbólumok magyarázata részben található.