

MOS v4 İçeren Cihazlar için Kullanım Talimatı

İN VİTRO TANI AMAÇLI KULLANIM İÇİNDİR. YALNIZCA DIŞA AKTARIM İÇİNDİR.

Kullanım Amacı

MiSeqDx cihazı, cihaz üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* tanı amaçlı (IVD) testlerle birlikte kullanıldığında periferik tam kandan veya formalinle fikse edilip parafine gömülmüş (FFPE) dokudan ekstrakte edilen insan genomik DNA'sından, DNA kütüphanelerinin hedeflenen sekanslaması için tasarlanmıştır. MiSeqDx cihazı tüm genom veya *de novo* sekanslama için tasarlanmamıştır. MiSeqDx cihazı tescilli ve listelenmiş, izinli veya onaylanmış IVD reaktifleri ve analitik yazılım ile kullanılmalıdır.

Prosedür İlkeleri

Illumina MiSeqDx; tescilli ve listelenmiş, izinli veya onaylı IVD reaktifleri kullanılarak periferik tam kan veya FFPE dokudan ekstrakte edilmiş insan genomik DNA'sından hazırlanan kütüphaneleri ve Illumina sekanslama sarf malzemelerini kullanarak insan DNA'sının hedeflenen yeniden sekanslaması için tasarlanmıştır. Kitaplıklar, hedefleri amplifiye ederek ve numune dizinleri ve yakalama sekansları eklenerek hazırlanır. Numune kütüphaneleri bir akış hücrelerinde yakalanır ve sentezle sekanslama (SBS) kimyasıyla cihaz üzerinde sekanslanır. SBS kimyası, büyüyen DNA zincirlerine kaynaştıkça tek nükleotid bazlarını saptamak için dönüştürülebilir terminatör yöntemini kullanır. Real-Time Analysis (RTA) yazılımı, görüntü analizi ve baz aramayı gerçekleştirir ve her bir sekanslama döngüsü için her baza bir kalite skoru atar. Birincil analiz sona erdiğinde, MiSeqDx cihazı üzerinde ikincil analiz baz aramalarını işler.

İşleme kapsamında tipik olarak çoğullama çözme, FASTQ dosya oluşturma, hizalama, varyant arama ve bir referans genomunda belirli konumlarda bulunan varyantlar hakkında bilgiler içeren varyant arama biçimi (VCF) dosyalarının oluşturulması yer alır. MiSeqDx iş akışına bağlı olarak farklı ikincil analiz kullanır.

Çift Önyükleme Yapılandırması

Çift önyükleme yapılandırması, MiSeqDx cihazının hem *in vitro* tanı amaçlı (IVD) hem de sadece araştırma amaçlı (RUO) sekanslama testlerini çalıştırabilmesi için gerekli donanım, yazılım ve kurulum prosedürlerini içerir. Çift önyükleme yapılandırması kullanıcının, cihazın tanı modu ile cihazın araştırma modu arasında geçiş yapmasına olanak sağlar. Sekanslama sarf malzemelerindeki radyo frekanslı tanıtıcılar (RFID) RUO sekanslama reaktiflerinin, tanı amaçlı sekanslama çalıştırmalarında kullanılmasını önerir.

Prosedür Kısıtlamaları

- *In Vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.

- Etiketle gösterilen sonuçlar, açıklanan reaktif ve yazılım modülleri ile germ hattı performansı için periferik tam kan veya hücre hatları ve somatik performans için FFPE doku veya FFPE hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen temsili test panelleri ile elde edilmiştir. Germline Variant ve Somatic Variant Modülleri, temsili miktar testleriyle performansı değerlendirmek amacıyla geliştirilmiştir. Performans özellikleri yalnızca bilgi amaçlı sunulmuştur. Sunulan doğrulama testi, yalnızca cihazın genel özelliklerini örneklendirmeye hizmet eder ve herhangi bir spesifik iddiaya ilişkin olarak cihazın özelliklerini veya uygunluğunu belirlemez. Bu cihazda kullanılmak üzere geliştirilen tüm tanı testleri, performansın tüm yönleri için tam doğrulama gerektirir.
- Bu ürün yalnızca aşağıdakileri sunar:
 - 2 x 150 bp okuma uzunluğunda ≥ 5 Gb sekanslama çıktısı
 - 2 x 150 bp okuma uzunluğunda ≥ 15 milyon Filtreyi Geçen Okuma
 - 2 x 150 bp okuma uzunluğunda Q30 \geq %80'den yüksek bazlar
Bazların %80'ine eşit veya daha fazlası, Phred ölçeği kalite skorlarınının 30'dan büyük olup, temel arama doğruluğunun %99,9'dan yüksek olduğunu gösterir.
- MiSeqDx cihazı yalnızca periferik tam kan veya FFPE dokudan ekstrakte edilmiş insan DNA kütüphanelerini sekanslamak için valide edilmiştir. Diğer numune türlerinden oluşturulan kitaplıklar *in vitro* tanı amaçlı kullanım için bu cihaz ile kullanılmamalıdır. Klinik numunelerden mikrobiyal veya viral nükleik asitleri sekanslamak için bu cihazın performansı belirlenmemiştir.
- MiSeqDx sistemi tescilli ve listelenmiş, izinli veya onaylanmış IVD reaktifleri veya testleri ile *in vitro* tanı amaçlı kullanım için tasarlanmıştır. Bu kullanım talimatında açıklanan reaktif kısıtlamaları ve performans özellikleri konusunda temsili testler ve yazılım modülleri temel alınmıştır. IVD testleri için kullanım amacı, saptanan varyantlar ve numune türleri için teste özgü kullanım talimatına bakın.
- Test yazılımı, 25 bp'den yüksek uzunluktaki Indel (insersiyonlar, delesyonlar ve bunların kombinasyonları) içeriğini hizalamaz. Sonuç olarak 25 bp'den yüksek uzunluktaki insersiyon/delesyonlar test yazılımı tarafından saptanamaz.
- Sistem, Germline ve Somatic Variant modül yazılımı ile birlikte kullanıldığında en fazla 25 bp delesyonlar ve 24 bp insersiyonlar ile tek nükleotid varyantlarının (SNV) saptaması için doğrulanmıştır. Somatik arama için, 0,05 varyant frekansında 25 bp delesyonlar ve 18 bp insersiyonlar saptanmıştır.
- Uç varyant içeriği olan amplikon okumaları test yazılımı tarafından hizalanmayabilir ve bu durum, bölgenin yabani tip olarak raporlanmasına neden olabilir. Bu tür uç içerikler şunları içerir:
 - Üçten fazla insersiyon/delesyon içeren okumalar.
 - Toplam amplikon hedef uzunluğunun %4'ünden yüksek SNV içeriği bulunan en az 30 bp uzunluğundaki okumalar (prob bölgeleri hariç).
 - Toplam amplikon uzunluğunun %10'undan yüksek SNV içeriği bulunan 30 bp'den düşük uzunluktaki okumalar (prob bölgeleri dahil).
- Çoklu nükleotid varyantları (MNV) ve büyük insersiyon/delesyonlar dahil olmak üzere büyük varyantlar, çıktı VCF dosyasında ayrı ayrı daha küçük varyantlar olarak raporlanabilir.

- Delesyon uzunluğu bölünmüş ampliconların arasındaki üst üste gelen kısımdan büyük veya bu kısma eşitse iki bölünmüş amplicon yayılırken delesyon varyantları filtrelenebilir veya kaçırılabilir.
- İnsersiyon/delesyon doğrudan bir primerin bitişiğinde meydana gelirse ve üst üste gelen bir amplicon yoksa sistem insersiyon/delesyonları saptayamaz. Üst üste gelen ampliconların bulunduğu bölgelerde, üst üste gelme bölgesi saptanacak delesyon boyutundan küçük olduğunda test delesyonları saptayamaz. Örneğin, iki bitişik amplicon arasındaki üst üste gelme iki (2) bazsa test bu bazların her ikisini içeren hiçbir delesyonu saptayamaz. Bu bazlardan birinde meydana gelen tek baz delesyonu ise saptanabilir.
- Tüm hibridizasyon temelli kitaplık hazırlama iş akışlarında olduğu gibi oligonükleotid bağlama bölgelerindeki altta yatan polimorfizmler, mutasyonlar, insersiyonlar veya delesyonlar alellerin problemlenmesini etkileyebilir. Sonuç olarak, sekanslama sırasında yapılan aramalar da etkilenir. Örneğin:
 - Primer bölgesinde varyant içeren fazdaki bir varyant, amplifiye edilmeyebilir ve böylece yalancı negatif sonuç elde edilebilir.
 - Primer bölgesindeki varyantlar referans alelin amplifikasyonunu engelleyebilir ve böylece hatalı homozigot varyant araması elde edilebilir.
 - Primer bölgesindeki insersiyon/delesyon varyantları, primere bitişik okumanın sonunda yalancı pozitif aramaya neden olabilir.
- İnsersiyon/delesyonlar, bir okumanın sonunda meydana geliyorsa ve hizalama sırasında yazılım tarafından kesiliyorsa zincir biası nedeniyle filtrelenebilirler.
- Küçük MNV'ler doğrulanmamıştır.
- Kopya sayısı varyantları veya yapısal varyantlar (füzyonlar veya translokasyonlar gibi) doğrulanmamıştır.
- Germ hattına özgü kısıtlamalar:
 - Germline Variant Module kullanan MiSeqDx sistemi, germ hattı varyant aramaları için kalitatif sonuçlar sunmak üzere tasarlanmıştır (ör. homozigot, heterozigot, yabani tip).
 - Germline Variant Module ile birlikte kullanıldığında doğru varyant araması için gereken amplicon başına minimum kapsam 150x şeklindedir. Numune sayısı ve hedeflenen toplam baz sayısı kapsamı etkiler. GC içeriği ve diğer genom içeriği, kapsamı etkileyebilir.
 - Kopya sayısı varyasyonu, bir varyantın homozigot veya heterozigot olarak tanımlanmasını etkileyebilir.
 - Belirli tekrarlı bağlamlardaki varyantlar VCF dosyalarında hariç tutulacak şekilde filtrelenir. RMxN tekrar filtresi, varyant sekansının tamamı veya bir kısmı varyant pozisyonuna bitişik referans genomda tekrarlı olarak mevcutsa varyantları filtrelemek için kullanılır. Germ hattı varyant aramasında, bir varyantın filtrelenmesi için referansta en az 9 tekrar olması gerekir ve yalnızca en fazla 5 bp uzunluğundaki tekrarlar değerlendirilir (R5x9).
- Somatiğe özgü kısıtlamalar:
 - Somatic Variant Module kullanan MiSeqDx sistemi, somatik varyant araması için kalitatif sonuçlar sunmak üzere tasarlanmıştır (ör. 0,05 saptama sınırı ile 0,026'dan yüksek veya buna eşit varyant frekansı içeren somatik varyantın varlığı).

- Somatic Variant Module ile birlikte kullanıldığında doğru varyant araması için gereken ampikon başına minimum kapsam, oligonükleotid havuzu başına 450x şeklindedir. Numune sayısı ve hedeflenen toplam baz sayısı kapsamlı etkiler. GC içeriği ve diğer genom içeriği, kapsamı etkileyebilir.
- Belirli tekrarlı bağlamlardaki varyantlar VCF dosyalarında hariç tutulacak şekilde filtrelenir. RMxN tekrar filtresi, varyant sekansının tamamı veya bir kısmı varyant pozisyonuna bitişik referans genomda tekrarlı olarak mevcutsa varyantları filtrelemek için kullanılır. Somatik varyant aramasında, bir varyantın filtrelenmesi için referansta en az 6 tekrar olması gerekir ve yalnızca en fazla 3 bp uzunluğundaki tekrarlar değerlendirilir (R3x6).
- Somatic Variant Module, germ hattı ile somatik varyantları ayırt edemez. Modül, geniş bir varyant frekansı yelpazesinde varyantları saptamak için tasarlanmıştır ancak varyant frekansı somatik varyantları germ hattı varyantlarından ayırmak için kullanılamaz.
- Numunedeki normal doku, varyantların saptanmasını etkiler. Raporlanan saptama sınırı, hem tümör dokusundan hem de normal dokudan ekstrakte edilen toplam DNA'ya nispeten varyant frekansına bağlıdır.

Ürün Bileşenleri

Illumina MiSeqDx aşağıdakilerden oluşur:

MiSeqDx Cihaz (Katalog No DX-410-1001)

Aşağıdaki yazılım bileşenleri MiSeqDx cihazının çalışması ve veri analizi için gereklidir:

Yazılım Uygulaması	İşlev	Açıklama
MiSeq Operating Software (MOS)	Cihaz çalışmasını denetler	MOS yazılım uygulaması, sekanslama esnasında cihazın çalışmasını yönetir ve Real-Time Analysis (RTA) yazılımı tarafından kullanılmak üzere görüntüler oluşturur. Daha fazla bilgi için bkz. <i>MOS v4 için MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Birincil analizi gerçekleştirir	RTA yazılım uygulaması, sekanslama çalışmasının her bir döngüsünde her kutucuk için MOS tarafından oluşturulan görüntüleri, Local Run Manager analiz modüllerinin girdileri olan baz arama dosyalarına dönüştürür. RTA yazılım uygulaması bir kullanıcı arayüzü içermez.
Local Run Manager	Modül seçimi için arayüz	Local Run Manager yazılımı kullanıcı yönetimi, ikincil analiz yürütme ve durum izleme için cihaz üzerinde entegre bir çözümdür. Daha fazla bilgi için bkz. <i>MiSeqDx için Local Run Manager v4 Yazılım Kılavuzu (belge no. 200046657)</i> .

Depolama ve Taşıma

Element	Spesifikasyon
Sıcaklık	Taşıma ve Saklama: -10 °C ila 40 °C (14 °F ila 104 °F). Çalışma Koşulları: 19 °C ila 25 °C (66 °F ila 77 °F)
Nem	Taşıma ve Saklama: Yoğuşmasız nem Çalışma Koşulları: %30–%75 bağıl nem (yoğunlaşmayan)

Gerekli Ekipmanlar ve Materyaller, Temin Edilmeyen

Sekanslama Sarf Malzemeleri

MiSeqDx Reagent Kit v3 (Katalog No. 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Katalog No. 20063860)

Kullanıcı Tarafından Tedarik Edilen Sarf Malzemeleri

Bir çalıştırma başlatmadan önce aşağıdaki kullanıcı tarafından tedarik edilen sarf malzemelerinin hazır olduğundan emin olun.

Sarf Malzemesi	Amaç
Alkollü mendiller, %70 İzopropil veya Etanol, %70	Akış hücresi camını ve aşamasını temizleme
Laboratuvar mendili, çok hav bırakmayan	Akış hücresi aşamasını temizleme
Lens temizleme kağıdı, 4 x 6 inç	Akış hücresini temizleme
Tween 20	Cihazı yıkama
Numune penseleri, kare uçlu plastik (isteğe bağlı)	Akış hücresini akış hücresi sevkiyat kabından çıkarma
Su, laboratuvar sınıfı	Cihazı yıkama

Laboratuvar Sınıfı Su Yönergeleri

Cihaz prosedürlerini gerçekleştirmek için her zaman laboratuvar sınıfı su veya deiyonize su kullanın. Hiçbir durumda musluk suyu kullanmayın.

Aşağıdaki su sınıflarını ya da eşdeğerlerini kullanın:

- Deiyonize su
- Illumina PW1
- 18 Megaohm (MΩ) su
- Milli-Q su
- Super-Q su
- Moleküler biyoloji sınıfı su

Uyarılar ve Tedbirler



UYARI

Bu reaktif seti potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması hâlinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Reaktiflerde tehlikeli maddelerin kullanımı için havalandırma uygun olmalıdır. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dâhil olmak üzere koruyucu donanım giyin. Kullanılan reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın. Ek çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için support.illumina.com/sds.html adresindeki SDS bölümüne başvurun.

- Tüm kan numunelerini insan immün yetmezlik virüsü (HIV), insan hepatit B virüsü (HBV) ve diğer kanla bulaşan patojen maddeleri bulaştırıcıymış gibi taşıyın (evrensel tedbirler).
- Belirtilen prosedürlerin uygulanmaması hatalı sonuçlara veya numune kalitesinde belirgin azalmaya neden olabilir.
- Rutin laboratuvar tedbirlerini uygulayın. Ağızınızla pipetlemeyin. Belirlenmiş çalışma alanlarında yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini kullanırken tek kullanımlık eldiven takın ve laboratuvar önlüğü giyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini elledikten sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- PCR ürünlerinin reaktifleri, cihazları ve genomik DNA numunelerini kontamine etmesini önlemek için uygun laboratuvar uygulamalarının ve iyi düzeyde laboratuvar hijyeninin sağlanması gerekir. PCR kontaminasyonu hatalı ve güvenilmez sonuçlar elde edilmesine yol açabilir.
- Kontaminasyonun önüne geçmek için pre-amplifikasyon ve post-amplifikasyon alanlarında özel ekipmanların ve sarf malzemelerinin bulunduğundan emin olun (ör. pipetler, pipet uçları, ısı blokları, vorteks cihazları ve santrifüjler).

- Uygun durumlarda, dizin-numune eşleştirme, yazdırılan plaka düzeniyle tam olarak eşleşmelidir. Local Run Manager, modüle girildiğinde numune adları ile ilişkili dizin primerlerini otomatik olarak doldurur. Kullanıcının sekanslama çalıştırmasını başlatmadan önce dizin primerlerinin numunelerle ilişkilendirildiğini doğrulaması tavsiye edilir. Numune ile plaka düzeni arasındaki uyumsuzluklar, pozitif numune tanımlamasının kaybına ve hatalı sonuç raporlamaya yol açar.
- Bilgisayarı virüslere karşı korumak için kullanıcı tarafından tedarik edilen bir anti-virüs yazılımının kurulması kesinlikle tavsiye edilir. Kurulum talimatları için kullanıcı kılavuzuna bakın.
- MiSeqDx cihazını, herhangi bir paneli çıkarılmış şekilde çalıştırmayın. Cihazın panelleri çıkarılmış şekilde çalıştırılması hat gerilimine ve DC gerilimlerine maruziyet olasılığına neden olur.
- Akış hücresi bölmesindeki akış hücresi aşamasına dokunmayın. Bu bölmedeki ısıtıcı 22 °C ile 95 °C arasında çalışır ve yanıklara neden olabilir.
- Cihaz yaklaşık 126 lb ağırlığındadır ve düşürülmesi ya da hatalı şekilde taşınması durumunda ciddi yaralanmalara neden olabilir.
- Bu ürünle ilgili olarak ortaya çıkan tüm ciddi olayları derhal Illumina'ya ve kullanıcının ve hastanın bulunduğu Üye Devletin Yetkili Makamına raporlayın.

Kullanım Talimatları

MiSeqDx cihazının aşağıdaki kullanma talimatları MiSeqDx Reagent Kit v3 içinde sağlanan reaktiflerin kullanımını gerektirir.

Local Run Manager ile Çalışma Oluştur

Bir çalışma oluşturmaya ilişkin ayrıntılı talimatlar için *MiSeqDx için Local Run Manager v4 Yazılım Kılavuzu* (belge no. 200046657) dahilindeki bilgilere ve kullandığınız analiz modülü için Local Run Manager modül kılavuzuna bakın.

Reaktif Kartuşunu Hazırlama

Aşağıdaki talimatlarda oda sıcaklığında su banyosu ile reaktiflerin buzunun çözülmesi açıklanmaktadır.

1. Reaktif kartuşunu -15 °C ila -25 °C depodan çıkarın.
2. Reaktif kartuşunun tabanını, reaktif kartuşunun üzerinde basılı olan su çizgisine dek batırmak için yeterli miktarda oda sıcaklığında deiyonize su içeren bir su banyosuna reaktif kartuşunu yerleştirin. Suyun maksimum su çizgisini aşmasına izin vermeyin.

Şekil 1 Maksimum Su Çizgisi



3. Reaktif kartuşunu yaklaşık 60-90 dakika veya buzu tamamen çözülene dek oda sıcaklığında su banyosunda çözülmeye bırakın.
4. Kartuşu su banyosundan çıkarın ve kartuşun tabanındaki suyun giderilmesi için kartuşu nazikçe tezgaha vurun. Kartuşun tabanını kurulaşın. Reaktif kartuşunun üst kısmına su sıçramadığından emin olun.

Reaktif Kartuşunu İnceleme

1. Buzu çözdürülen reaktifleri karıştırmak için reaktif kartuşunu on kez ters çevirin ve ardından tüm konumların buzunun çözülüp çözülmediğini inceleyin.
2. Tamamen karıştıklarından ve çökelti içermediklerinden emin olmak için konum 1, 2 ve 4'teki reaktifleri inceleyin.

NOT Düzgün bir şekilde sekanslama yapılabilmesi için kartuştaki reaktiflerin iyice buzlarının çözülmüş ve karışmış olmaları kritiktir.

3. Reaktiflerdeki hava kabarcıklarını azaltmak için kartuşu nazikçe tezgaha vurun.

NOT MiSeqDx kamış tüpleri, reaktiflerin aspire edilmesi için her bir haznenin alt kısmına uzanır. Dolayısıyla haznelerde hava kabarcıklarının olmaması önemlidir.

4. Çalıştırma kurulumuna hazır olana dek reaktif kartuşunu buza yerleştirin veya 2 °C ila 8 °C'de (en fazla altı saat) kenara koyun. En iyi sonuçlar için doğrudan numuneyi yüklemeye ve çalıştırmayı ayarlamaya geçin.

Sekanslama için Numuneleri Hazırlama

Kütüphane seyreltme ve havuzlama dahil olmak üzere sekanslama için numune kütüphanelerini hazırlama talimatları için kütüphane hazırlama kullanım talimatının Kullanım Talimatları bölümüne bakın.

Numune kitaplıklarının seyreltilmesi, oligonükleotid havuzlarının karmaşıklık düzeyine bağlıdır. MiSeqDx üzerinde küme yoğunluğunun optimizasyonu gereklidir ve ideal küme yoğunluğu kütüphane hazırlama testine bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Kartuşa Numune Kitaplıklarını Yükleme

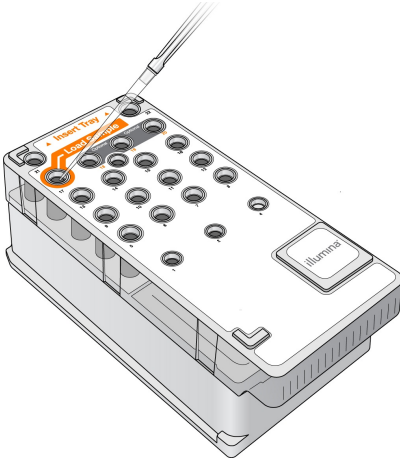
Reaktif kartuşu buzu tamamen çözülmüş ve kullanıma hazır durumda olduğunda numuneleri kartuşa yüklemeye hazır olursunuz.

1. Ayrı, temiz ve boş bir 1 ml'lik pipet ucunu kullanarak **Load Samples** (Numuneleri Yükle) etiketli reaktif kartuşundaki haznenin üzerinde yer alan folyo kapağı delin.

NOT Diğer reaktif konumlarını delmeyin. Diğer reaktif konumları çalıştırma sırasında otomatik olarak delinir.

2. **Load Samples** (Numuneleri Yükle) haznesinin içine hazırlanmış 600 µl seyreltilmiş ampikon kitaplığı (DAL) numune kitaplıklarını pipetleyin. Folyo kapağa dokunmayın.
3. Numuneyi yükledikten sonra haznede hava kabarcığı olup olmadığını kontrol edin. Hava kabarcıkları varsa kabarcıkları gidermek için kartuşu nazikçe tezgaha vurun.

Şekil 2 Kütüphaneleri Yükleme



4. MiSeq Operating Software (MOS) arayüzünü kullanarak doğrudan çalıştırma kurulumu adımlarına ilerleyin.

Çalıştırma Kurulumu

Tüm çalışma kurulum talimatları için bkz. *MOS v4 için MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 200010452)*..

1. Local Run Manager yazılım parolanız ile MiSeqDx'te oturum açın.
2. MOS yazılımının Home (Ana) ekranından **Sequence** (Sekans) ögesini seçin.
3. Listedenden bir çalıştırma seçin ve ardından **Next** (Sonraki) ögesini seçin.
Bir dizi çalışma kurulum ekranı aşağıdaki sırayla açılır: Akış Hücreini Yükleme, Reaktifleri Yükleme, İnceleme ve Çalışma Öncesi kontrol.
4. Load Flow Cell (Akış Hücresi Yükleme) ekranı görüntülediğinde, akış hücreini temizleyin ve yükleyin.
5. Akış hücresi mandalını ve akış hücresi bölmesi kapağını kapatın.
Çalıştırmayı başlatmadan önce mandal ve bölme kapağının ikisi de kapalı olmalıdır. Akış hücresi yüklendiğinde, yazılım RFID'yi okur ve kaydeder. Ekranın sağ alt köşesinde RFID'nin başarıyla okunduğuna dair bir onay görüntülenecektir.
6. Yazılım istemlerini uygulayarak MiSeqDx SBS Solution (PR2) şişesini yükleyin, atık şişesinin boş olduğundan emin olun ve reaktif kartuşunu yükleyin.

MiSeqDx SBS Solution (PR2) şişesi ve reaktif kartuşu yüklendiğinde yazılım RFID'yi okur ve kaydeder. Ekranın sağ alt köşesinde RFID'nin başarıyla okunduğuna dair bir onay görüntülenecektir.

7. Çalıştırma başladığında Sequencing (Sekanslama) ekranı açılır. Bu ekran, yoğunluklar ve kalite skorları (Q skorları) dahil olacak şekilde devam eden çalıştırmanın görsel anlatımını sunar.

Sonuçlar

Real-Time Analysis (RTA), görüntü analizi ve baz aramayı gerçekleştiren ve her bir sekanslama döngüsü için her baza bir kalite skoru atayan entegre bir yazılımdır. Birincil analiz sona erdiğinde MiSeqDx cihazı üzerinde [Local Run Manager ile Çalışma Oluştur sayfa 7](#)'de seçilen modül burada açıklandığı şekilde ikincil analize başlar. Diğer iş akışları için teste özgü belgelere bakın.

Kalite Kontrol Prosedürleri

MiSeqDx yazılımı her çalıştırma, numune ve baz aramayı kalite kontrol metriklerine göre değerlendirir. Gerekliğinde, kitaplık hazırlığında dahil edilen pozitif ve negatif kontroller de beklenen sonuçlar için değerlendirilmelidir.

Performans Özellikleri

Tüm çalışmalar MiSeqDx üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Germ hattı çalışmalarında, kitaplık hazırlama için MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ya da TruSeq Custom Amplicon Kit Dx reaktifleri kullanılmıştır. İki kit aynı kitaplık hazırlama reaktiflerini kullanır ve yalnızca bir iş akışı farkı vardır: polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngülerinin sayısı (sırasıyla 25 ve 28). Ek PCR döngüleri, TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanılarak yapılan DNA girdi çalışmasında gösterildiği gibi, MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay'e (250 ng) kıyasla TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) ile daha düşük bir DNA girdisine izin verir. MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ile hazırlanan kitaplıklar kit içindeki eşlik eden sekanslama reaktifleri ile sekanslanmıştır. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ile hazırlanan kütüphaneler MiSeqDx Reagent Kit v3 ile sekanslanmıştır. Sonraki sekanslama reaktifleri MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay'e kıyasla daha yüksek çıktıya sahiptir.

Test, MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro tarafından desteklenen örnek çıktı aralıklarını kapsar. MiSeqDx, teste bağlı olarak 1-96 numune/çalıştırmayı destekleyebilir. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro, seçilen testler için bu aralık dahilinde daha düşük numune çıktıları desteklemek üzere tasarlanmıştır.

Somatik çalışmalarda MiSeqDx Reagent Kit v3 ile TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanılmıştır.

Sekanslama için kitaplıklar hazırlamak üzere TruSeq Custom Amplicon Kit Dx için açıklanan germ hattı veya somatik iş akışları, iki istisna dışında sırasıyla Germline Variant Module veya Somatic Variant Module kullanılarak analiz ile takip edilmiştir. Temsili mutasyon panelleri olarak bir geni (germ hattı performans; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) veya iki geni (somatik performans) kullanan çalışmalarda teste özgü iş akışları ve analiz modülleri kullanılmıştır.

NOT Amplikon genomik içeriği, sekanslanan genomik zincire kıyasla özetlenmiştir. Eksi zincire karşı tasarlanan amplikonlar için referans genom içeriği ters tamamlayıcıdır (örneğin, eksi zincirli amplikonlardaki PolyA bölgeleri, referans genomdaki PolyT bölgelerine karşılık gelir).

Performans Özelliklerinde Kullanılan Hesaplamaların Tanımları

- Pozitif Yüzde Uyumu (PPA), testin doğru raporladığı ve referans yönetime göre varyant olarak sınıflandırılan loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $(\text{testin doğru şekilde raporladığı varyant loküsü sayısı}) / (\text{toplam varyant loküsü sayısı})$
Test tarafından raporlanan ve referans yöntemle uyumlu olan varyant loküsler gerçek pozitiflerdir (TP'ler). Test tarafından referans aramaları veya farklı varyant aramaları olarak raporlanan varyant loküsler yalancı negatiflerdir (FN'ler).
- Negatif Yüzde Uyumu (NPA), testin doğru raporladığı ve referans yönetime göre yabancı tip olarak sınıflandırılan loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $(\text{testin doğru şekilde raporladığı yabancı tip loküsü sayısı}) / (\text{toplam yabancı tip loküsü sayısı})$
Test tarafından raporlanan ve referans yöntemle uyumlu olan yabancı tip loküsler gerçek negatiflerdir (TN'ler). Test tarafından varyant olarak raporlanan yabancı tip loküsler yalancı pozitiflerdir (FP'ler).
- Genel yüzde uyumu (OPA), referans yönetime nispeten test tarafından doğru raporlanmış loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $((\text{testin doğru şekilde raporladığı varyant loküsü sayısı}) + (\text{testin doğru şekilde raporladığı yabancı tip loküsü sayısı})) / ((\text{toplam varyant loküsü sayısı}) + (\text{toplam yabancı tip loküsü sayısı}))$
- Varyant arama uygulamaları için, PPA, NPA ve OPA hesaplamaları no call'ları (bir veya daha fazla kalite filtresini karşılamayan varyant veya referans loküsler) içermez. İki çalışmada "doğru arama yüzdesi" metriklerinde no call'lar özellikle dahil edilmiştir ve no call'ların dahil edildiği ilgili tablolarda belirtilmiştir.
- Arama oranları, filtreleri geçen toplam loküs sayısının, kromozom 1-22 için toplam sekanslanan konum sayısına bölünmesiyle hesaplanır. X ve Y kromozomları hariç tutulur. Bu metrik, aramaların referans yöntemle uyumunu dikkate almaz.

Pre-analitik faktörler (ör. ekstraksiyon yöntemleri veya DNA girdisi) ile ilgili performans özellikleri için geçerli kütüphane hazırlama yöntemi ile ilgili kullanım talimatına bakın.

Numune Dizinleme

Kitaplık hazırlama sırasında eklenen numune dizin primerleri, her numune DNA'ya benzersiz bir sekans atar ve birden fazla numunenin tek bir sekanslama çalıştırmasında birleştirilmesini sağlar. Numune dizinleme; germ hattı ve somatik iş akışları için test edilmiştir.

Belirli bir numune için farklı dizinleme primer kombinasyonları arasında tutarlı bir şekilde genotipleme araması yapmak amacıyla testin yeteneklerini doğrulamak için 23 insan kromozomunun tamamında zincir başına 12.588 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulayacak şekilde tasarlanmış temsili bir test ile toplam 96 numune dizini test edilmiştir. Y kromozomu güvenilir bölgeler içermez ve değerlendirilmemiştir. Sekiz benzersiz numune, numune başına 12 farklı dizinleme primer kombinasyonu ile test edilmiştir. Germline Analysis Module'den gelen numune sonuçları Platinum Genomes sürüm 2016-01 ile kıyaslanmıştır. 96 dizin kombinasyonunun her biri için PPA (SNV'ler ve insersiyon/delesyonlar) %97'yi aşmıştır (gerçek pozitif aramalar SNV'ler için en az 70, insersiyonlar için 38, delesyonlar için 36 olmuştur) ve NPA %100 olmuştur (dizin kombinasyonu başına en az 23.440 referans konum). MiSeqDx Reagent Kit v3 sekanslama kimyasının sekizden az numuneyi destekleyebileceğini onaylamak için bağımsız olarak tek bir dizin test edilmiştir (MiSeqDx Universal Kit 1.0'de bulunan önceki kimya minimum sekiz numune ile sınırlandırılmıştır). Bu tek dizin için PPA değerleri SNV'ler için %98,9 (180/182), insersiyonlar için %100 (38/38) ve delesyonlar için %100 (46/46) olmuştur. NPA %100 (23.856/23.856) olmuştur.

Somatic Variant Module kullanılarak 0,05-0,10 frekanslarında somatik varyantlar ile dizin doğruluğunu ölçmek için bir numunenin on iki kopyası (24 kitaplık) test edilmiştir (somatik aramalar için kopya başına iki dizin kombinasyonu kullanılmıştır). PPA SNV'ler (64/64), insersiyonlar (11/11) ve delesyonlar (19/19) için %100 olmuştur. NPA tüm dizin kombinasyonları için %100 olmuştur (dizin kombinasyonu başına en az 11.590 referans konum).

Numune Taşıma

MiSeqDx cihazı iş akışı kütüphane hazırlama ve çoklu numunelerin sekanslanmasını ve hepsi bir kerede işlenen kontrolleri içerir. Numune Taşıma çalışması, numune kütüphanesi hazırlama sırasında kuyudan kuyuya kontaminasyonun yanı sıra ardışık sekanslama çalıştırmaları arasında çalıştırmadan çalıştırmaya kontaminasyondan kaynaklanan taşıma nedeniyle yalancı pozitif sonuçların test sonuçlarına etkisi olup olmadığını değerlendirmek için yapılmıştır. Germ hattı varyantlarına göre daha düşük alel frekansı olaylarında saptanabildikleri için somatik varyantlar kullanılmıştır.

Numuneler, hücre hatlarından dört genomik DNA numunesinden (temsili iki gen testinde her biri farklı panel mutasyonları içeren) oluşmuştur. Numuneler, bir tanesinde bir konumdaki mutasyonun diğerlerinde bir referans (yabani tip) sekansı olacak şekildeydi.

Kuyudan kuyuya taşıma, manuel işleme adımları (pipetleme, numune karışıklığı vb.) dolayısıyla potansiyel olarak oluşabilen bir hata modu olarak tanımlanır. Bir numune kuyusundan diğerine taşımayı değerlendirmek amacıyla iki test çalıştırması gerçekleştirilmiştir:

- Gen 1'de bir mutasyon içeren yüksek girdili genomik DNA (gDNA) numunesinin, Gen 2'de bir mutant içeren düşük girdili gDNA numunesiyle değişimli dama tahtası düzeni.
- Gen 2'de bir mutasyon içeren yüksek girdili gDNA numunesinin, Gen 1'de bir mutasyon içeren düşük girdili gDNA numunesiyle değişimli dama tahtası düzeni.

Her çalıştırmada toplam 12 kopya yalancı pozitifler için değerlendirilmiştir (ör. bir kuyuda raporlanan Gen 1 mutasyonunun Gen 2 mutant numune olarak belirlenmesi veya tam tersi).

alıştırmadan çalıştırmaya taşıma, önceki bir sekanslama çalıştırmasından kalan artıklardan potansiyel olarak oluşabilen bir hata modu olarak tanımlanır. Sekanslama çalıştırmaları arasında taşıma olup olmadığını belirlemek için her biri yüksek girdili gDNA'dan tek bir benzersiz numunenin 11 kopyası ve bir kr numune içeren iki plaka hazırlanmış, bir MiSeqDx cihazında ardışık olarak sekanslanmış ve yalancı pozitifler için değerlendirilmiştir. İlk alıştırma Gen 2 mutant numunenin 11 kopyasını ve bir kr içermiştir. İkinci alıştırma Gen 1 mutant numunenin 11 kopyasını ve 1 kr içermiştir. İlk olarak Gen 2 mutant numune kitaplığı sekanslanmış, bunu Gen 1 mutant numune kitaplığı ile bir sonraki sekanslama alıştırması takip etmiş, ardından Gen 2 mutant numune kitaplığının bir başka tekrar sekanslama alıştırması yapılmıştır. Yalnızca Gen 1 mutant çalışmasında herhangi bir Gen 2 mutasyonu gözlemlenirse veya bunun tersi olursa bu taşıma olduğunu belirtir.

Kuyudan kuyuya taşımadan kaynaklı sıfır yalancı pozitif (0/24, %0) raporlanmıştır. Tüm beklenen mutasyonlar saptanmıştır. *alıştırmadan çalıştırmaya* taşımadan kaynaklı sıfır yalancı pozitif (0/24, %0) raporlanmıştır. Tüm beklenen mutasyonlar saptanmıştır. *Toplam* taşımadan (kuyudan kuyuya ve çalıştırmadan çalıştırmaya taşıma birleştirilmiş) kaynaklı sıfır yalancı pozitif (0/48, %0) raporlanmıştır.

Germ Hattı Performans Özellikleri

Burada açıklanan çalışmalarda, sekanslama verilerini analiz etmek için Germline Variant Module kullanılmıştır. Teste özgü modül kullanılan bir gen panelini kullanan çalışmalar hariçtir.

Doğruluk

Aşağıdaki çalışma MiSeqDx cihazının MiSeqDx Reagent Kit v3 ve yüksek kalite DNA ile doğruluğunu değerlendirmek için yapılmıştır. Bu çalışmada, 150 ampikon kullanarak 23 farklı kromozomda 12.588 bazı kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılmıştır. Y kromozomu güvenilir bölgeler içermez ve değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada kullanılan 12 benzersiz numune, sıklıkla birden fazla laboratuvar ve sekanslama yöntemi ile sekanslanmış tek bir aileden (iki ebeveyn ve 10 çocuk) alınmıştır. Kadınlardan beş, erkeklerden yedi numune vardır. Numunelerin her biri iki kopya olarak test edilmiştir. SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, çalışma verilerinin iyi karakterize edilmiş bir referans veritabanıyla karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Referans veritabanı sekansı (Platinum Genomes sürüm 2016-01), birden fazla sekanslama yönteminin, halka açık verilerin ve kalıtsal bilgilerin birleşiminden türetilmiştir. Güvenilir genomik bölgeler, aksi belirtilmedikçe bu referans yöntemine göre tanımlanmıştır. Numuneler toplamda sekiz kez çalıştırılmıştır, doğruluğu göstermek için sunulan tablolar ilk çalıştırmadan elde edilen verilere dayanmaktadır.

Tablo 1, varyant sonuçlarının PPA hesaplamaları için iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında pozitif ve negatif yüzde uyumu ile sunulan çalışma verilerini içermektedir. Üç varyant türü (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) birleştirilmiştir. Referans yöntem yalnızca tek nükleotid varyantları ve insersiyon/delesyonları için sonuçları sağladığından, varyant olmayan baz sonuçları NPA hesapları için insan genom referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılır.

Tablo 1 Numune Başına MiSeqDx Cihazı Baz Arama Sonuçlarının Uyumu

Numune	Ortalama Arama Oranı	Toplam Varyant Sayısı	Toplam TP Varyant Sayısı	Toplam FN Varyant Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	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
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9

Numune	Ortalama Arama Oranı	Toplam Varyant Sayısı	Toplam TP Varyant Sayısı	Toplam FN Varyant Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	PPA	NPA	OPA
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

Temsili test, çeşitli genomik içerikleri kapsamak amacıyla tasarlanmış 150 amplicondan oluşmuştur. Ampliconların GC içeriği %26-87 aralığında olmuştur. Ampliconlar ayrıca bir dizi tek nükleotid (ör. PolyA, PolyT), dinükleotid ve trinükleotid tekrarları içermiştir. Veriler, genomik içeriğin doğru arama yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemek için amplicon bazında derlenmiştir [Tablo 2](#). Doğru arama yüzdesi, varyant ve referans aramalardan oluşur ve yanlış arama veya no call olması durumunda %100'den azdır. No call'lar varyant arama için bir veya daha fazla filtrenin karşılanmaması durumunda meydana gelir (ör. yetersiz kapsam).

[Tablo 2](#)'deki sekiz FN varyantından yedisi, aynı zamanda PolyA homopolimeri ve 0,29 GC içeriği içeren amplicon 111 üzerinde 1 bp'lik bir insersiyon ile meydana gelmiştir. Kalan 1 FN (hatalı arama), amplicon 125 üzerinde 0,68 GC içeriğine sahip beklenen bir heterozigot SNV'nin homozigot varyant olarak aranmasından kaynaklanmıştır. SNV varyant frekansı 0,71 olmuştur ve bu, homozigot varyant olarak sınıflandırmak için eşik olan 0,70'in üzerindedir. En düşük doğru arama yüzdesi (%98,2) olan amplicon; 40 no call ve AT tekrarları ve %27'lik GC içeriği olan amplicon 17 olmuştur.

Tablo 2 MiSeqDx Cihazı için Amplikon Düzeyinde Doğruluk

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
1	1	36450499	36450591	93	93	İnseriyon/Delesyon	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), inseriyon/delesyon	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	İnseriyon/Delesyon	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	İnseriyon/Delesyon	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), inseriyon/delesyon	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), inseriyon/delesyon	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	İnseriyon/Delesyon	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	İnseriyon/Delesyon	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Geçerli Değil	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), inseriyon/delesyon	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), inseriyon/delesyon	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Geçerli Değil	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), inseriyon/delesyon	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), inseriyon/delesyon	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Geçerli Değil	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), inseriyon/delesyon	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	İnseriyon/Delesyon	0,57	1774	0	2	99,9

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
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	Geçerli Değil	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	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	Geçerli Değil	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	İnsersiyon/Delesyon	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
46	7	110939946	110940030	85	85	İnversiyon/Delesyon	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), inversiyon/delesyon	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), inversiyon/delesyon	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Geçerli Değil	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	İnversiyon/Delesyon	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Geçerli Değil	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), inversiyon/delesyon	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	İnversiyon/Delesyon	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	İnversiyon/Delesyon	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Geçerli Değil	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), inversiyon/delesyon	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), inversiyon/delesyon	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	İnversiyon/Delesyon	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), inversiyon/delesyon	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Geçerli Değil	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Geçerli Değil	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Geçerli Değil	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	İnversiyon/Delesyon	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Geçerli Değil	0,65	2400	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
70	11	59837679	59837740	62	62	İnseriyon/Delesyon	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	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	İnseriyon/Delesyon	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), insersiyon/delesyon	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	İnseriyon/Delesyon	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	İnseriyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	İnseriyon/Delesyon	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	İnseriyon/Delesyon	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	İnseriyon/Delesyon	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
95	15	63446149	63446216	68	68	İnsersiyon/Delesyon	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Geçerli Değil	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), insersiyon/delesyon	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon (x2)	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), insersiyon/delesyon	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,37	2184	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), insersiyon/delesyon	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), insersiyon/delesyon	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), insersiyon/delesyon	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Geçerli Değil	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Geçerli Değil	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Geçerli Değil	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Geçerli Değil	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	İnsersiyon/Delesyon	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	İnsersiyon/Delesyon	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	İnsersiyon/Delesyon	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Geçerli Değil	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	İnsersiyon/Delesyon	0,46	2328	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
143	22	37637596	37637694	99	99	Geçerli Değil	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Geçerli Değil	0,55	0	0	0	Geçerli Değil
149	Y	2655519	2655609	91	0	Geçerli Değil	0,48	0	0	0	Geçerli Değil
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Geçerli Değil

No call olan varyantlar [Tablo 3](#)'de özetlenmiştir. No call ile sonuçlanan belirli filtreler tabloda listelenmiştir. Amplikon 111 üzerindeki insersiyon, 16 gerçekleşmenin dokuzu için filtrelenmiştir ve kalan yedi gerçekleşme referans olarak aranmış, bu nedenle FN olmuştur.

Tablo 3 No Call Varyantların Özeti

Amplikon Sayısı	Kro:Kon	Varyant	İlgili Amplikon İçeriği	Filtre	Kaçırılan Varyantlar	Beklenen Varyantlar	FN Aramalar
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), %42 GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), %29 GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Tekrar filtresi. Bir varyantın tamamı veya bir kısmı referans genomda varyant pozisyonunun bitişiğinde tekrarlı olarak mevcutsa varyant filtrelenir. Referansta en az dokuz tekrar olması gerekir ve yalnızca en fazla 5 bp uzunluğundaki tekrarlar değerlendirilir.

Numune NA12878 için sekanslama sonuçları, National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) tarafından oluşturulan NA12878 için oldukça güvenilir bir genotip ile karşılaştırılmıştır. 150 amplikon içerisinden, NIST sekansında 92 amplikon tamamen oldukça güvenli genomik bölgeler içinde olmuştur, 41 amplikon kısmi örtüşme göstermiştir ve 17 amplikon örtüşmemiştir. Bu, karşılaştırma için kopya başına 10.000 koordinatla sonuçlanmıştır. Varyant olmayan baz aramaları, insan genomu referans sekans yapısı 19 ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk sonuçları [Tablo 4](#) içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 4 NA12878 Numunesi için NIST Veritabanı ile MiSeqDx Cihazı Baz Arama Sonuçlarının Uyumu

Numune	Amplikon Sayısı	Ortalama Arama Oranı	Toplam TP Varyant Sayısı	Toplam FN Varyant Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	Toplam FP Arama Sayısı	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Numuneler küçük insersiyon ve delesyonları (indel'ler) aramak için ilaveten analiz edilmiştir (Tablo 5). Bazı durumlarda, İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı sütununda yansıtıldığı gibi, insersiyon/delesyon iki veya daha fazla örnek arasında ortak. 12 geçerli numunenin her iki kopyası için sonuçlar Tablo 5'de yer almaktadır. Boyutları insersiyonlar için 1-24 bp, delesyonlar için 1-25 bp arasında değişen toplam 71 insersiyon/delesyon vardı. 69 insersiyon/delesyonun her biri %100 pozitif yüzde uyumu ile saptandı. Bir delesyon (amplikon 64; 2 bp delesyonu (chr10 55892600 TAC>T) doğru aramaya sahip değildi çünkü bu varyantların her biri R5x9 filtresi nedeniyle no-call değildi. Bu nedenle, no-call'ları dışlayan PPA hesaplanamamıştır. Başka bir indel, 1 bp insersiyonu (amplikon 111'de chr17 39589692 C>CA), ayrıca doğru aramalara da sahip değildi, çünkü dokuz varyant R5x9 filtresi nedeniyle no-call idi ve yedisi FN aramalarıydı.

Tablo 5 MiSeqDx Cihazı ile İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	PPA
1	1	36450544	93	25 bp delesyon	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp delesyon	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp insersiyon	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp delesyon	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp insersiyon	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp insersiyon	C>CATG	10	0	0	10	100

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	PPA
8	2	55862804	90	7 bp insersiyon	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 bp delesyon	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp insersiyon	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp insersiyon	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp insersiyon	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp delesyon	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp insersiyon	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp delesyon	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp delesyon	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp insersiyon	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp delesyon	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp insersiyon	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp delesyon	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp delesyon	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp delesyon	CTTTCACCTTCCCCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp delesyon	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp insersiyon	C>CT	16	0	0	16	100

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	PPA
46	7	110939983	85	4 bp delesyon	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp insersiyon	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp delesyon	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp delesyon	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp delesyon	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp insersiyon	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp insersiyon	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp delesyon	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp delesyon	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp delesyon	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp delesyon	TAC>T	10	10	0	0	Geçerli Değil
68	11	30177690	70	2 bp insersiyon	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp insersiyon	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp delesyon	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp delesyon	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp insersiyon	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp insersiyon	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/ Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/ Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/ Delesyon Araması Sayısı	PPA
85	13	44880152	89	4 bp insersiyon	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp delesyon	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp delesyon	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp insersiyon	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp delesyon	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp delesyon	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp delesyon	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp delesyon	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp insersiyon	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp insersiyon	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp delesyon	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp delesyon	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp insersiyon	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp insersiyon	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp insersiyon	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp insersiyon	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp delesyon	CAGTG>C	12	0	0	12	100

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/ Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/ Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/ Delesyon Araması Sayısı	PPA
114	17	61502459	79	12 bp delesyon	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp insersiyon	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp insersiyon	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp delesyon	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp delesyon	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp insersiyon	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 bp insersiyon	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp delesyon	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp insersiyon	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp delesyon	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp delesyon	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp insersiyon	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp insersiyon	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp delesyon	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Tekrarlanabilirlik

MiSeqDx cihazının, hücre hatları (çalışma 1 ve 2) veya hücre hatları katılmış lökositten yoksun kan (çalışma 2) ile tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için iki çalışma yapılmıştır. Çalışma 1, birden fazla cihaz kullanmıştır. Çalışma 2, birden fazla tesis içermiştir.

Çalışma 1

MiSeqDx cihazının tekrarlanabilirliği, iki cihaz, iki operatör ve iki reaktif lotu kullanarak toplam sekiz çalıştırma ile belirlenmiştir. Temsili test, numuneler ve referans yöntemler doğruluk çalışmasında açıklananlar ile aynıdır.

Aramanın cihazlar arasında tekrarlanabilir olduğunu göstermek için sonuçlar her cihaz için ampikon bazında sunulmuştur (Tablo 6). Doğru arama yüzdesi; hatalı aramaları ve no call'ları (varyant arama için bir veya daha fazla filtre karşılamayan) içermektedir. Cihazlar, belirli ampikona bağlı olarak benzer sayıda no call ve hatalı arama üretmiştir.

Tablo 6 MiSeqDx Cihazı İçin Cihazdan Cihaza Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları (Ampikon düzeyinde)

Ampikon	Kromozom	Ampikon Başlangıcı	Ampikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Ampikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
1	1	36450499	36450591	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), insersiyon/delesyon	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), insersiyon/delesyon	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	İnsersiyon/Delesyon	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	İnsersiyon/Delesyon	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), insersiyon/delesyon	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Geçerli Değil	0,43	8928	0	0	8928	0	0

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), insersiyon/delesyon	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Geçerli Değil	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), insersiyon/delesyon	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
21	3	190106030	190106104	75	74	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), insersiyon/delesyon	0,61	8979	0	45	8979	0	45

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
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	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	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	Geçerli Değil	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	İnsersiyon/Delesyon	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	İnsersiyon/Delesyon	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), insersiyon/delesyon	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), insersiyon/delesyon	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Geçerli Değil	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Geçerli Değil	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), insersiyon/delesyon	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), insersiyon/delesyon	0,47	7488	0	0	7488	0	0

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
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	İnsersiyon/Delesyon	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), insersiyon/delesyon	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Geçerli Değil	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Geçerli Değil	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Geçerli Değil	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Geçerli Değil	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	İnsersiyon/Delesyon	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	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	İnsersiyon/Delesyon	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	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	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	0,52	7008	0	0	7008	0	0

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), insersiyon/delesyon	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	İnsersiyon/Delesyon	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	İnsersiyon/Delesyon	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Geçerli Değil	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), insersiyon/delesyon	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), insersiyon/delesyon	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), insersiyon/delesyon	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), insersiyon/delesyon	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Geçerli Değil	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Geçerli Değil	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Geçerli Değil	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Geçerli Değil	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Geçerli Değil	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
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), insersiyon/delesyon	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	İnsersiyon/Delesyon	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	İnsersiyon/Delesyon	0,35	6336	0	0	6336	0	0
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), insersiyon/delesyon	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Geçerli Değil	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	İnsersiyon/Delesyon	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Geçerli Değil	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Geçerli Değil	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Geçerli Değil	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları varyant frekansı kullanarak operatör bazında analiz edilmiştir [Tablo 7](#). Bu analiz, varyant frekanslarının operatörler arasında tutarlı olduğunu göstermiştir. Ortalama varyant frekansları (+/- 1 standart sapma) gösterilmiştir.

Tablo 7 MiSeqDx Cihazı için Operatörden Operatöre Sonuçlar

Varyant Frekansı Aralığı	Benzersiz Varyant Sayısı	Toplam Analiz Edilen Varyant Sayısı Operatör 1	Toplam Analiz Edilen Varyant Sayısı Operatör 2	Ortalama (SS) Raporlanan Varyant Frekansı Operatör 1	Ortalama (SS) Raporlanan Varyant Frekansı Operatör 2
Homozigot (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozigot (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Her numune için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları, tüm sekiz çalıştırmadan birleştirilmiş şekilde gösterilmiştir [Tablo 8](#). Saptama, her bir varyant türü için (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ayrı ayrı değerlendirilir. Referans konumlar hariç tutulur. Bu analiz, varyantlar için sonuçların numuneler arasında tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

Tablo 8 Numune Başına MiSeqDx Cihazı Baz Arama Sonuçlarının Uyumu

Numune	SNV'ler				İnsersiyonlar				Delesyonlar			
	Toplam Sayı	Toplam TP Sayısı	Toplam FP Sayısı	Toplam FN Sayısı	Toplam Sayı	Toplam TP Sayısı	Toplam FP Sayısı	Toplam FN Sayısı	Toplam Sayı	Toplam TP Sayısı	Toplam FP Sayısı	Toplam FN Sayısı
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	1	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	1
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

Bu tekrarlanabilirlik çalışmasında sekiz çalıştırma tarafından sağlanan veriler, MiSeqDx cihazının tutarlı bir şekilde aşağıdakileri sekanslayabildiği iddiasını desteklemektedir:

- GC içeriği \geq %19 (%19 GC içerikli 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %1,1 olmuştur)
- GC içeriği \leq %78 (%78 GC içerikli 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call sıfır olmuştur)
- PolyA uzunlukları \leq 8 (PolyA = 8 içeren 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde 8 nükleotidin PolyA tekrarı doğru aranmıştır)
- PolyT uzunlukları \leq 10 (PolyT = 10 içeren 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde 10 nükleotidin PolyT tekrarı doğru aranmıştır)
- PolyG uzunlukları \leq 7 (PolyG = 7 içeren 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde 7 nükleotidin PolyG tekrarı doğru aranmıştır)
- PolyC uzunlukları \leq 6 (PolyC = 6 içeren 576 sekanslanan amplikondan 576'sında 6 nükleotidin PolyC tekrarı doğru aranmıştır)
- Dinükleotid tekrar uzunlukları \leq 11x (11x dinükleotid tekrarı olan 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %0,5 olmuştur)
- Trinükleotid tekrar uzunlukları \leq 5x (5x trinükleotid tekrarı olan 192 sekanslanan amplikondan 192'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %0,5 olmuştur)
- 24 veya daha az baz insersiyonu ve 25 veya daha az baz delesyonu
 - 192 numunenin 192'sinde 24-baz insersiyonu doğru aranmıştır
 - 224 numunenin 223'ünde 25-baz delesyonu doğru aranmış ve 1 numunede yanlış aranmıştır

Çalışma 2

Temsili test olan Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay ile gerçekleştirilen bir tesisten tesise tekrarlanabilirlik çalışması, MiSeqDx Platform hedefli DNA sekanslama iş akışı kullanılarak MiSeq Reporter yazılımıyla analiz edilen bir *CFTR* klinik olarak anlamlı genetik varyasyon alt kümesini içermiştir. Bu kör çalışmada, 3 araştırma tesisi ve her tesiste 2 operatör kullanılmıştır. Her biri 46 numuneden oluşan iyi karakterize edilmiş iki panel, her tesisteki operatörlerin her biri tarafından tesis başına toplam 810 arama olacak şekilde test edilmiştir. Paneller, *CFTR* geninde bilinen varyantlara sahip hücre hatlarından genomik DNA'nın bir karışımının yanı sıra *CFTR* geninde bilinen varyantlara sahip hücre hatları katılmış lökositten yoksun kan içermiştir. Test iş akışı için birincil girdi olarak hizmet eden gDNA'yı hazırlamak için kullanılan ekstraksiyon adımlarının dahil edilmesini sağlamak için kan numuneleri sunulmuştur. İlk denemede KK metriklerini geçen numune sayısı olarak tanımlanan numune geçme oranı %99,88 olmuştur. Tüm test sonuçları ilk teste dayanmaktadır.

Tablo 9 Temsili MiSeqDx 139-Variant Assay ile Gerçekleştirilen Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçlarının Özeti

Panel	Numune Sayısı	Numune Genotipi	Varyantlar	Tesis Başına Toplam Arama	Pozitif Uyumlu Aramalar (Varyantlar)			Negatif Uyumlu Aramalar (Yabani Tip)			Yanlış Arama Sayısı	No Call Sayısı	Pozitif Uyum (%)	Negatif Uyum (%)	Genel Uyum (%)
					Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3	Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3					
					A	1	S549N (HET)		810	6					
A	2	1812-1 G>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
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 mevcut değil	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

Panel	Numune Sayısı	Numune Genotipi	Varyantlar	Tesis Başına Toplam Arama	Pozitif Uyumlu Aramalar (Varyantlar)			Negatif Uyumlu Aramalar (Yabani Tip)			Yanlış Arama Sayısı	No Call Sayısı	Pozitif Uyum (%)	Negatif Uyum (%)	Genel Uyum (%)
					Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3	Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3					
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	Geerli Değil	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
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	Geçerli Değil	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

Panel	Numune Sayısı	Numune Genotipi	Varyantlar	Tesis Başına Toplam Arama	Pozitif Uyumlu Aramalar (Varyantlar)			Negatif Uyumlu Aramalar (Yabani Tip)			Yanlış Arama Sayısı	No Call Sayısı	Pozitif Uyum (%)	Negatif Uyum (%)	Genel Uyum (%)
					Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3	Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3					
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Geçerli Değil	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
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Geerli Değil	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	Geçerli Değil	100	100

Panel	Numune Sayısı	Numune Genotipi	Varyantlar	Tesis Başına Toplam Arama	Pozitif Uyumlu Aramalar (Varyantlar)			Negatif Uyumlu Aramalar (Yabani Tip)			Yanlış Arama Sayısı	No Call Sayısı	Pozitif Uyum (%)	Negatif Uyum (%)	Genel Uyum (%)
					Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3	Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3					
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	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	Geerli Değil	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	Geerli Değil	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
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Geerli Değil	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

Panel	Numune Sayısı	Numune Genotipi	Varyantlar	Tesis Başına Toplam Arama	Pozitif Uyumlu Aramalar (Varyantlar)			Negatif Uyumlu Aramalar (Yabani Tip)			Yanlış Arama Sayısı	No Call Sayısı	Pozitif Uyum (%)	Negatif Uyum (%)	Genel Uyum (%)
					Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3	Tesis 1	Tesis 2	Tesis 3					
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>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	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	100	100
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
Toplam				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Bir kopya için N1303K varyantına karşılık gelen yabani tip konumu, yetersiz kapsama nedeniyle No Call ile sonuçlanmıştır.

² Numune 5 ve 75'in bir kopyası %0 arama oranına sahip olmuştur. Tüplerde kalan numune hacimleri hiç hacim çıkarılmamış hali ile tutarlı olduğundan, ek araştırmalar numunelerin kitaplık hazırlamadan önce numune plakasına eklenmemiş olabileceğini göstermektedir.

³ Kanıtlar, numune 9 ve 10'un büyük olasılıkla kitaplık hazırlamadan önce operatör tarafından değiştirildiğini göstermektedir.

⁴ İki numunenin her birinin bir kopyası için M1V varyantına karşılık gelen yabani tip konumu, yetersiz kapsama nedeniyle No Call ile sonuçlanmıştır.

Somatik Performans Özellikleri

Burada açıklanan çalışmalarda, sekanslama verilerini analiz etmek için Somatic Variant Module kullanılmıştır. Teste özgü modül kullanılan iki gen panelini kullanan çalışmalar hariçtir.

Doğruluk

MiSeqDx cihazının FFPE numunelerinden ekstrakte edilmiş DNA ile doğruluğunu değerlendirmek için üç çalışma yapılmıştır.

Çalışma 1

Bu çalışmada, 150 amplikon kullanarak 23 farklı kromozomda 12.588 bazı kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılmıştır. Y kromozomu güvenilir bölgeler içermez ve değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada kullanılan beş benzersiz numune, sıklıkla birden fazla laboratuvar ve sekanslama yöntemi ile sekanslanmış tek bir aileden (iki ebeveyn ve üç çocuk) alınmıştır. Kadınlardan üç, erkeklerden iki numune vardır. Çalışma için DNA ekstrakte edilmeden önce tüm numuneler formalinle fikse edilip parafine gömülmüştür. Frekansları %5 ve %10 civarında olan bir dizi varyant elde etmek amacıyla, numune GM12877 DNA seviyesinde numune GM12878 ile seyreltilerek numune GM12877-D oluşturulmuştur. Beş kopya ile test edilen GM12877-D dışındaki her numune iki kopya olarak test edilmiştir. SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, çalışma verilerinin iyi karakterize edilmiş bir referans veritabanıyla karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Referans veritabanı sekansı (Platinum Genomes sürüm 2016-01), birden fazla sekanslama yönteminin, halka açık verilerin ve kalıtsal bilgilerin birleşiminden türetilmiştir. Güvenilir genomik bölgeler, aksi belirtilmedikçe bu referans yöntemine göre tanımlanmıştır. Numuneler toplamda sekiz kez çalıştırılmıştır. Doğruluğu göstermek için sunulan tablolar, ilk çalıştırmadan elde edilen verilere dayanmaktadır.

Tablo 10, varyant sonuçlarının PPA hesaplamaları için iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında pozitif ve negatif yüzde uyumu ile sunulan çalışma verilerini içermektedir. Üç varyant türü (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) birleştirilmiştir. Referans yöntem yalnızca tek nükleotid varyantları ve insersiyon/delesyonları için sonuçları sağladığından, varyant olmayan baz sonuçları NPA hesapları için insan genom referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılır.

Tablo 10 İyi Karakterize Edilmiş Numune için MiSeqDx Cihazı Baz Arama Sonuçlarının Referans Veriler ile Uyumu

Numune	Ortalama Arama Oranı	Toplam Varyant Sayısı	Toplam TP Varyant Sayısı	Toplam FN Varyant Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	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

Numune	Ortalama Arama Oranı	Toplam Varyant Sayısı	Toplam TP Varyant Sayısı	Toplam FN Varyant Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	PPA	NPA	OPA
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 Frekansı %20'nin üstünde olan varyantlar.

² Frekansı %20'nin altında olan varyant.

150 amplikon çeşitli genomik içerikleri kapsamak amacıyla tasarlanmıştır. Amplikonların GC içeriği %26-87 aralığında olmuştur. Amplikonlar ayrıca bir dizi tek nükleotid (ör. PolyA, PolyT), dinükleotid ve trinükleotid tekrarları içermiştir. Testte 6 benzersiz numune kullanılmıştır. Veriler, genomik içeriğin doğru arama yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemek için amplikon bazında derlenmiştir **Tablo 11**. Doğru arama yüzdesi, varyant ve referans aramalardan oluşur ve yanlış arama veya no call olması durumunda %100'den azdır. No call'lar varyant arama için bir veya daha fazla filtrenin karşılanmaması durumunda meydana gelir (ör. yetersiz kapsam). Hiç hatalı arama olmamıştır. No call'ların sayısı amplikonlar arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. GC içeriği ve GC içeriğiyle çeşitli etkileşimler, no call'ların en önemli belirleyicileri olmuştur. 2040/2580 (%79) adet no call, kapsam spesifikasyonunun karşılanmamasından kaynaklanmıştır. %78'den fazla GC içeriğine sahip amplikonlar, en fazla no call'a neden olmuştur. %78 GC içeriği olan temsili bir amplikon toplam 675 no call içermiştir. %87 olan temsili bir amplikon toplam 1365 no call içermiştir. Akış hücrelerine yüklenen numune sayısı azaltılarak kapsam artırılabilir, bu da yüksek GC içeriğine sahip amplikonlarda saptamaya izin verebilir.

Tablo 11 Amplikon Düzeyinde Doğruluk Verileri

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
1	1	36450499	36450591	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), insersiyon/delesyon	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,39	1050	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), insersiyon/delesyon	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	İnsersiyon/Delesyon	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	İnsersiyon/Delesyon	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), insersiyon/delesyon	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Geçerli Değil	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), insersiyon/delesyon	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Geçerli Değil	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Geçerli Değil	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
30	5	41069808	41069871	64	64	Geçerli Değil	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	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	Geçerli Değil	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	İnsersiyon/Delesyon	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	İnsersiyon/Delesyon	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), insersiyon/delesyon	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), insersiyon/delesyon	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Geçerli Değil	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Geçerli Değil	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), insersiyon/delesyon	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	İnsersiyon/Delesyon	0,3	1005	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	İnsersiyon/Delesyon	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), insersiyon/delesyon	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Geçerli Değil	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Geçerli Değil	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Geçerli Değil	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Geçerli Değil	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	İnsersiyon/Delesyon	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Geçerli Değil	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Geçerli Değil	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	İnsersiyon/Delesyon	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,52	1260	0	14	98,9

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), insersiyon/delesyon	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	İnsersiyon/Delesyon	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	İnsersiyon/Delesyon	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Geçerli Değil	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Geçerli Değil	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

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon (x2)	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), insersiyon/delesyon	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), insersiyon/delesyon	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), insersiyon/delesyon	00,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Geçerli Değil	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Geçerli Değil	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Geçerli Değil	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Geçerli Değil	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Geçerli Değil	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	Toplam Doğru Arama Sayısı	Toplam Hatalı Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	Doğru Arama Yüzdesi
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), insersiyon/delesyon	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	İnsersiyon/Delesyon	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Geçerli Değil	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	İnsersiyon/Delesyon	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Geçerli Değil	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Geçerli Değil	0,55	0	0	0	Geçerli Değil
149	Y	2655519	2655609	91	0	Geçerli Değil	0,48	0	0	0	Geçerli Değil
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Geçerli Değil

No call olan varyantlar [Tablo 12](#)'de özetlenmiştir. No call ile sonuçlanan belirli filtreler tabloda listelenmiştir.

Tablo 12 No Call Varyantların Özeti

Amplikon Sayısı	Kro:Kon	Varyant	İlgili Amplikon İçeriği	Filtre	Kaçırılan Varyantlar	Beklenen Varyantlar
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: Düşük kapsam. Bu belirli konumdaki havuzlardan en az birindeki derinlik 900'ün altındaysa varyant filtrelenir.

² R3x6: Tekrar filtresi. Bir varyantın tamamı veya bir kısmı referans genomda varyant pozisyonunun bitişiğinde tekrarlı olarak mevcutsa varyant filtrelenir. Referansta en az altı tekrar olması gerekir ve yalnızca en fazla 3 bp uzunluğundaki tekrarlar değerlendirilir.

Numune için sekanslama sonuçları, National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) tarafından oluşturulan NA12878 için oldukça güvenilir bir genotip ile karşılaştırılmıştır. 150 amplikon içerisinden, NIST sekansında 92 amplikon tamamen oldukça güvenli genomik bölgeler içinde olmuştur, 41 amplikon kısmi örtüşme göstermiştir ve 17 amplikon örtüşmemiştir. Bu, karşılaştırma için kopya başına 10.000 koordinatla sonuçlanmıştır. Varyant olmayan baz aramaları, insan genomu referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk sonuçları [Tablo 13](#) içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 13 GM12878 Numunesi İçin NIST Referansı ile MiSeqDx Cihazı Baz Arama Sonuçlarının Uyumu

Numune	Amplikon Sayısı	Ortalama Arama Oranı	Toplam TP Varyant Araması Sayısı	Toplam FN Varyant Araması Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	Toplam FP Arama Sayısı	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Beş seyreltilmemiş numune küçük insersiyon ve delesyonları (indel'ler) aramak için ilaveten analiz edilmiştir ([Tablo 14](#)). Bazı durumlarda, insersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı sütununda yansıtıldığı gibi, insersiyon/delesyon iki veya daha fazla örnek arasında ortak. Beş numunenin her iki kopyası için sonuçlar [Tablo 14](#)'de yer almaktadır. Boyutları insersiyonlar için 1-24 bp, delesyonlar için 1-25 bp arasında değişen toplam 71 insersiyon/delesyon vardı. 68 insersiyon/delesyonun her biri 1 pozitif yüzde uyumu ile saptandı. Bu varyantların her biri R3x6 filtresinden dolayı no-call olduğundan üç insersiyon ve delesyonda doğru arama olmamıştır. Bu nedenle, no call'ları hariç tutan PPA hesaplanamadı. Bu üç varyant 1 bp delesyon (chr8 24811064 AG>A); 2 bp delesyon (chr10 55892600 TAC>T) ve 1 bp insersiyon (chr17 39589692 C>CA) idi.

Tablo 14 MiSeqDx Cihazı ile İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	PPA
1	1	36450544	93	25 bp delesyon	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp delesyon	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp insersiyon	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp delesyon	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp insersiyon	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp insersiyon	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp insersiyon	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp delesyon	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp insersiyon	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp insersiyon	C>CTGAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 bp insersiyon	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp delesyon	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp insersiyon	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp delesyon	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp delesyon	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp insersiyon	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp delesyon	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp insersiyon	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp delesyon	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp delesyon	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp delesyon	CTTTCACTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp delesyon	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp insersiyon	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp delesyon	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp insersiyon	T>TC	15	0	0	15	100

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	PPA
48	7	149503916	91	4 bp delesyon	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp delesyon	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp delesyon	AG>A	15	15	0	0	Geçerli Değil
53	8	76518677	67	4 bp insersiyon	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp insersiyon	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp delesyon	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp delesyon	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp delesyon	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp delesyon	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp insersiyon	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp insersiyon	T>TTATGAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp delesyon	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp delesyon	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp insersiyon	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp insersiyon	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp insersiyon	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp delesyon	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp delesyon	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp insersiyon	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp delesyon	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp delesyon	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp delesyon	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp delesyon	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp insersiyon	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp insersiyon	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp delesyon	ATTATTTTC>A	11	0	0	11	100

Amplikon	Kromozom	Konum	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Amplikon İnsersiyon/Delesyon Türü ve Uzunluğu	İnsersiyon/Delesyon	İnsersiyon/Delesyon İçeren Toplam Numune Kopyası Sayısı	No Call Sayısı	Toplam Hatalı İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	Toplam Doğru İnsersiyon/Delesyon Araması Sayısı	PPA
107	17	3594276	87	1 bp delesyon	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp insersiyon	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp insersiyon	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp insersiyon	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp insersiyon	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp delesyon	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp delesyon	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp insersiyon	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp insersiyon	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp delesyon	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp delesyon	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp insersiyon	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp insersiyon	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp delesyon	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp insersiyon	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp delesyon	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp delesyon	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp insersiyon	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp insersiyon	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp delesyon	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Çalışma 2

Bu çalışmada depolanan FFPE kolorektal kanser doku numuneleri ve referans yöntem olan çift yönlü Sanger sekanslaması (Sanger) ile karşılaştırılan temsili iki gen testi kullanılmıştır. Toplam 1183 gönüllüden 441'inin geçerli Sanger ve temsili test sonuçları bulunmaktaydı. Gönüllü düzeyinde değerlendirildiğinde (Tablo 15), 441 gönüllüden 230'u Sanger'e göre pozitif çıkmıştır (Sanger tarafından mutasyon

saptanmıştır). Bunların 227'si temsili teste göre pozitif olmuştur. 441'den kalan 211 gönüllü Sanger'e göre negatif olmuştur (Sanger tarafından mutasyon saptanmadı). Bunların 206'sı temsili teste göre negatif olmuştur. Bu %98,7 Pozitif Yüzde Uyumu (PPA) ve %97,6 Negatif Yüzde Uyumu (NPA) ile sonuçlanmıştır (Tablo 15).

Tablo 15 Gönüllü Düzeyinde Sonuçların Pozitif ve Negatif Yüzde Uyumu

Temsili Test	Sanger		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	227 ¹	5	232
Negatif	3 ²	206	209
Toplam	230	211	441

Performans Özeti		
Uyum İstatistik	Nokta Tahmini	Tam %95 GA
PPA	227/230 = %98,7	[%96,2,%99,7]
NPA	206/211 = %97,6	[%94,6,%99,2]

¹Gönüllü içi, tüm mutasyon düzeyindeki sonuçlar için 224 tam eşleşme bulunmaktaydı. İki gönüllü için MiSeqDx, Sanger tarafından saptanan mutasyonu ve bir ek mutasyonu saptamıştır. Bir gönüllü için MiSeqDx ve Sanger farklı mutasyonlar saptamıştır.

²Bir gönüllünün Sanger tarafından saptanan iki mutasyonu bulunmaktaydı. İki gönüllünün Sanger tarafından saptanan bir mutasyonu bulunmaktaydı.

Çalışma 3

Bu çalışmada, birden fazla doku türünde FFPE numunelerinden hazırlanan DNA kitaplıkları değerlendirilmiştir. Her doku türünü temsil eden en az 11 FFPE numunesi ile toplamda sekiz farklı dokudan (kolon, yumurtalık, pankreas, böbrek üstü bezi, idrar kesesi, karaciğer, tiroid ve meme) 109 FFPE numunesi. Böbrek üstü bezi dokusu, yemek borusu, akciğer ve kolon tümörlerinden metastaz içermiştir. Diğer dokuda birincil tümörler vardı. Bu çalışmada, 17 farklı kromozomda 21.577 bazı kapsayacak şekilde 26 geni sorgulamak için temsili bir test tasarımı kullanılmıştır. Toplam altı farklı gen (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* ve *BRAF*), o tümör için somatik mutasyonların beklenen prevalansına dayalı olarak her tümörün 1-3 Sanger sekanslı geni olacak şekilde Sanger sekanslanmıştır. Sanger sekanslama sonuçları 109 FFPE numunesinin 33'ünde 39 SNV somatik mutasyon belirlemiştir. MiSeqDx, bir yalancı negatif ve iki varyant konumu no

call ile 109 FFPE numunenin 32'sinde 36 SNV somatik mutasyon belirlemiştir. PPA %97,3 olmuştur. MiSeqDx, Sanger sekanslamaya kıyasla 29 yalancı pozitif ve 3416 no call ile 109 FFPE numunesinde 78.975 referans baz belirlemiştir. NPA %99,9 olmuştur. İki baz delesyonu iki yöntem arasında uyumlu olmuştur. [Tablo 16](#) ile doku türüne göre sonuçların özeti sunulmaktadır.

Tablo 16 Doku Türüne Göre Pozitif ve Negatif Yüzde Uyumu

Doku Türü	Numune Sayısı	Toplam Varyant Sayısı	Toplam TP Varyant Sayısı	Toplam FN Varyant Sayısı	Toplam TN Arama Sayısı	Toplam FP Arama Sayısı	Toplam No Call Sayısı	PPA	NPA
Böbrek Üstü Bezi	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
İdrar Kesesi	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Göğüs	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Kolon	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Karaciğer	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Yumurtalık	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Pankreas	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Tiroid	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Toplam	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	>99,9

Tekrarlanabilirlik

MiSeqDx cihazının, FFPE numunelerinden ekstrakte edilmiş DNA ile tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için iki çalışma yapılmıştır. Çalışma 1, birden fazla cihaz kullanmıştır. Çalışma 2, birden fazla tesis içermiştir.

Çalışma 1

MiSeqDx cihazının tekrarlanabilirliği, iki cihaz ve iki eğitimli operatör kullanarak toplam sekiz çalıştırma ile belirlenmiştir. Temsili test, ampikon genomik içeriği, numuneler ve referans yöntemler yukarıdaki doğruluk çalışması 1'de açıklananlar ile aynıdır. Aramanın cihazlar arasında tekrarlanabilir olduğunu göstermek için sonuçlar her cihaz için ampikon bazında sunulmuştur [Tablo 17](#). Doğru arama yüzdesi hatalı arama ve no call'ları (varyant arama için bir veya daha fazla filtre karşılamayan) içermektedir. Cihazlar, belirli ampikona bağlı olarak benzer sayıda no call üretmiştir. MiSeqDx 1 için Platinum Genomes referans standardıyla tanımlanan şekilde kendinden emin bir bölge içinde tek bir yanlış arama gözlenmiştir. Yanlış arama 55892599 ile 55892687 pozisyonlarında ampikon 64'te kromozom 10'u sorgulayan bir insersiyon varyantının yanlış pozitif aramasıdır. Ampikonun dinükleotid tekrarı 11 olmuştur.

Tablo 17 MiSeqDx Cihazı için Cihazdan Cihaza Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları (Amplikon düzeyinde)

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
1	1	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), insersiyon/delesyon	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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) insersiyon/delesyon	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), insersiyon/delesyon	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	İnsersiyon/Delesyon	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	İnsersiyon/Delesyon	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Geçerli Değil	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
13	2	87	87	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), insersiyon/delesyon	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Geçerli Değil	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), insersiyon/delesyon	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Geçerli Değil	0,43	4980	0	0	4980	0	0

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
19	3	70	70	CT(3), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	İnsersiyon/Delesyon	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), insersiyon/delesyon	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
39	6	95	95	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon	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	Geçerli Değil	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), insersiyon/delesyon	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), insersiyon/delesyon	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Geçerli Değil	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Geçerli Değil	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), insersiyon/delesyon	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), insersiyon/delesyon	0,47	4679	0	1	4680	0	0

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
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	İnsersiyon/Delesyon	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), insersiyon/delesyon	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Geçerli Değil	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Geçerli Değil	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Geçerli Değil	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Geçerli Değil	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	İnsersiyon/Delesyon	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Geçerli Değil	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	Geçerli Değil	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	İnsersiyon/Delesyon	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), insersiyon/delesyon	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), insersiyon/delesyon	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	Geçerli Değil	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
83	13	73	73	Geçerli Değil	0,52	4380	0	0	4379	0	1

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), insersiyon/delesyon	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	İnsersiyon/Delesyon	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), insersiyon/delesyon	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	İnsersiyon/Delesyon	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), insersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Geçerli Değil	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Geçerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,37	5443	0	17	5444	0	16

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), insersiyon/delesyon	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	İnsersiyon/Delesyon	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), insersiyon/delesyon (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), insersiyon/delesyon	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	İnsersiyon/Delesyon	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	Geerli Değil	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), insersiyon/delesyon	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), insersiyon/delesyon	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), insersiyon/delesyon	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Geçerli Değil	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Geçerli Değil	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Geçerli Değil	0,68	4440	0	0	4438	0	2

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
126	19	70	70	Geçerli Değil	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Geçerli Değil	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), İnsersiyon/delesyon	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	İnsersiyon/Delesyon	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	İnsersiyon/Delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	İnsersiyon/Delesyon	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), İnsersiyon/delesyon	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), İnsersiyon/delesyon	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	İnsersiyon/Delesyon	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Geçerli Değil	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	İnsersiyon/Delesyon	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Geçerli Değil	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	İnsersiyon/Delesyon	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	Geçerli Değil	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Geçerli Değil	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Geçerli Değil	0,48	0	0	0	0	0	0

Amplikon	Kromozom	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC İçeriği	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı	Toplam Doğru Aramalar	Toplam Hatalı Aramalar	Toplam No Call Sayısı
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları varyant frekansı kullanarak operatör bazında analiz edilmiştir [Tablo 18](#). Bu analiz, varyant frekanslarının operatörler arasında tutarlı olduğunu göstermiştir. Ortalama varyant frekansları (+/- 1 standart sapma) gösterilmiştir.

Tablo 18 MiSeqDx Cihazı için Operatörden Operatöre Sonuçlar

Varyant Frekansı Aralığı	Benzersiz Varyant Sayısı	Toplam Analiz Edilen Varyant Sayısı Operatör 1	Toplam Analiz Edilen Varyant Sayısı Operatör 2	Ortalama (SS) Raporlanan Varyant Frekansı Operatör 1	Ortalama (SS) Raporlanan Varyant Frekansı Operatör 2
Yüksek frekans (~%100)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Orta frekans (~%50)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Düşük frekans (%3-7)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Her numune için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları, tüm sekiz çalıştırmadan birleştirilmiş şekilde gösterilmiştir [Tablo 19](#). Saptama, her bir varyant türü için ayrı ayrı değerlendirilir— SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar ayrı ayrı. Referans verilen konumlar hariç tutulur. Bu analiz, varyantlar için sonuçların numuneler arasında tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

Tablo 19 Numune Başına MiSeqDx Cihazı Baz Arama Sonuçlarının Uyumu

Numune	SNV'ler				İnsersiyonlar				Delesyonlar			
	Toplam Sayı	Toplam TP Sayısı	Toplam FP Sayısı	Toplam FN Sayısı	Toplam Sayı	Toplam TP Sayısı	Toplam FP Sayısı	Toplam FN Sayısı	Toplam Sayı	Toplam TP Sayısı	Toplam FP Sayısı	Toplam FN Sayısı
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

¹Frekans %20'nin üstünde olan varyantlar.

²Frekans %20'nin altında olan varyant.

Bu tekrarlanabilirlik çalışmasında 8 çalıştırma tarafından sağlanan veriler, MiSeqDx cihazının tutarlı bir şekilde aşağıdakileri sekanslayabildiği iddiasını desteklemektedir:

- GC içeriği \geq %19 (%19 GC içerikli 120 sekanslanan amplikondan 120'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %3,4 olmuştur)
- GC içeriği \leq %73 (%73 GC içerikli 120 sekanslanan amplikondan 120'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %0,1 olmuştur)
- PolyA uzunlukları \leq 8 (PolyA = 8 içeren 120 sekanslanan amplikondan 120'sinde 8 nükleotidin PolyA tekrarı doğru aranmıştır)
- PolyT uzunlukları \leq 10 (PolyT = 10 içeren 120 sekanslanan amplikondan 120'sinde 10 nükleotidin PolyT tekrarı doğru aranmıştır)
- PolyG uzunlukları \leq 6 (PolyG = 6 içeren 720 sekanslanan amplikondan 720'sinde 6 nükleotidin PolyG tekrarı doğru aranmıştır)
- PolyC uzunlukları \leq 6 (PolyC = 6 içeren 360 sekanslanan amplikondan 359'unda 6 nükleotidin PolyC tekrarı doğru aranmıştır, 1 no-call olmuştur)

- Dinükleotid tekrar uzunlukları $\leq 4x$ (4x dinükleotid tekrarı olan 600 sekanslanan amplikondan 600'ünde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %0,4 olmuştur)
- Trinükleotid tekrar uzunlukları $\leq 5x$ (5x trinükleotid tekrarı olan 120 sekanslanan amplikondan 120'sinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no-call oranı %1,9 olmuştur)
- 24 veya daha az baz insersiyonu ve 25 veya daha az baz delesyonu
 - 120 numunenin 120'sinde 24-baz insersiyonu doğru aranmıştır
 - 184 numunenin 182'sinde 25-baz delesyonu doğru aranmıştır ve 2 numunede no-call olarak raporlanmıştır

Çalışma 2

Doğruluk çalışması 2'de açıklanan temsili iki gen testinin üç harici test tesisi (tesis başına iki operatör), bir reaktif lotu ve ardışık olmayan üç test günü boyunca tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için harici bir çalışma yapılmıştır. Test, FFPE klinik numunelerinden veya hücre hatlarından alınan genomik DNA numunelerinin iyi karakterize edilmiş altı numune paneli ile gerçekleştirilmiştir. Her panelde 10 üye olacak şekilde toplamda panellerde 60 üye bulunmuştur.

60 panel üyesi, dört benzersiz yabancı tip (panel mutasyonları için) numunenin ikili kopyalarından, hem yüksek hem de düşük mutasyon frekans düzeylerinde hazırlanmış 12 benzersiz mutant numuneden (tek mutasyonlu) ve sadece düşük mutasyon frekans düzeyinde hazırlanmış iki benzersiz mutant numuneden (tek mutasyonlu) oluşmuştur. Tüm sonuçlar geçerliyse her benzersiz numune/mutasyon frekans düzeyi numunesi (her çalıştırmada iki kopya halinde test edilmiştir) 36 olası sonuca (2 tekrar \times 2 operatör \times 3 gün \times 3 tesis) sahip olmuştur.

Tüm pozitif ve negatif varyantlardaki Beklenen Arama Yüzdesi (PEC), her numunede temsili test sonucunun, beklenen mutasyon sonucu (beklenen mutasyon saptandı veya saptanmadı) ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. PEC, beklenen arama sayısının, denenen arama sayısına bölünmesiyle elde edilen değer %100 katı olarak hesaplanır. İki taraflı %95 güven aralığı Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Tesisleri birleştiren, numunenin ilk çalıştırmasında veya ilk geçişte geçerli olan çalıştırmalarda test edilen numunelerde numune geçiş oranları \geq %94,7 olmuştur. Tüm mutant numunelerde mutasyon düzeyinde PEC %99,6 olmuştur (905/909) (%95 GA; 98,9, 99,8). Tüm geçerli numuneler için 56 panel mutasyonunun tamamında (saptanan bir mutasyonun beklenip beklenmediğinden bağımsız olarak) denenen arama sayısı 58.856 (56 \times 1051) olmuştur. Bu 58.856 mutasyon düzeyinde gözlemden, gözlemlenen ve beklenen sonuçların uyumsuz olduğu sadece altı olay olmuştur. Tüm mutant ve yabancı tip panel üyelerinden elde edilen tüm pozitif ve negatif varyantlarda mutasyon düzeyinde PEC %99,99 (58.850/58.856) olmuştur.

Analitik Duyarlılık (Kör Sınırı (LoB) ve Saptama Sınırı (LoD))

Bu çalışmada, test eşiği doğrulanmış ve temsili bir panel ile MiSeqDx için Saptama Sınırı (LoD) belirlenmiştir. Kısaca, iyi karakterize edilmiş Platinum Genome hücre hatları GM12878 ve GM12877 formalinle fikse edilip parafine gömülmüş ve ardından DNA ekstrakte edilmiştir. GM12878, yetmiş varyantın (52 SNV, dokuz insersiyon ve dokuz delesyon) varyant frekansları 0,05'e yakın olacak şekilde GM12877 ile seyreltilmiştir. İki DNA numunesi, toplam 10 MiSeqDx sekanslama çalıştırması için iki cihaz ve iki reaktif lotu kullanılarak iki operatör tarafından test edilmiştir. Bu, her reaktif lotu için GM12878'deki her varyant için 40 kopya ve GM12877'de karşılık gelen her yabancı tip koordinatı için 60 kopya ile sonuçlanmıştır. LoB ve LoD, parametrik olmayan seçenek kullanılarak CLSI EP17-A2'de belirtilen klasik yaklaşım ile hesaplanmıştır. LoB ve LoD, belirli bir varyant türü için varyant frekansları bir araya getirilerek SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Tip I hata 0,01 olarak tanımlanmıştır ve tip II hata 0,05 olarak tanımlanmıştır.

LoB için, havuzlanmış varyant frekansları en düşükten en yükseğe doğru sıralanmış ve her varyant türünün her reaktif lotu için 99. sıra konumu hesaplanmıştır (Tablo 20). MiSeqDx yazılımı, varyantların kalitatif saptamasını belirlemek için 0,026 varyant frekansında bir eşik (etkin LoB) kullanır. Hesaplanan kör sınırları bu eşiğin 0,01'den fazla olmayan bir tip I hatası ile sonuçlandığını doğrulamıştır.

Tablo 20 Kör Sınırı

Varyant Türü	Toplam Varyant Frekansı Sayısı	LoB Reaktif Lotu 1 (%)	LoB Reaktif Lotu 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
İnsersiyon	540	0,79	0,60
Delesyon	540	0,96	0,84

LoD için 0,026 eşiğinin altına düşen her varyant türünün her reaktif lotu için münferit mutasyon frekansının yüzdesi hesaplanmıştır (Tablo 21). Yüzdeler %5 (0,05) tip II hatasından daha düşük oldukları için birleştirilmiş varyant frekanslarının medyanı LoD olarak hesaplanmıştır (Tablo 21). Her varyant türü için LoD olarak, iki reaktif lotu için hesaplanmış iki değerden büyük olanı alınmıştır; SNV'ler için %5,45, insersiyonlar için %4,88 ve delesyonlar için %5,44.

Tablo 21 Saptama Sınırı

Reaktif Lotu	Varyant Türü	Toplam Varyant Frekansı Sayısı	VF Ölçümlerinin Sayısı < %2,6	VF Ölçümlerinin Yüzdesi < %2,6	Saptama Sınırı (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	İnsersiyon	360	0	0,00	4,86
	Delesyon	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	İnsersiyon	360	0	0,00	4,88
	Delesyon	360	0	0,00	5,24

Aşağıdaki çalışmalar, klinik olarak anlamlı iki kanser geninde 56 mutasyonu hedefleyen başka bir temsili testle MiSeqDx'in performans özelliklerini göstermektedir (Mutasyon paneli). Mutasyon paneli, klinik olarak anlamlı iki kanser genindeki 56 mutasyonu spesifik olarak saptamak için tasarlanmıştır (Gen 1 ve Gen 2). Test, sekanslanmış her numunede 56 mutasyonun her birinin varlığını veya yokluğunu aynı anda belirler. Bu çalışmalar için referans yöntem çift yönlü Sanger sekanslamasıdır.

Lottan Lota Kesinlik

MiSeqDx cihazının performansını üretilmiş reaktif kit lotları (numune kalifikasyonu, kitaplık hazırlama ve sekanslama reaktiflerinden oluşan) boyunca değerlendirmek için, numune kalifikasyon gereksinimlerini karşılayan beş harmanlanmış FFPE numunesinden oluşan bir paneli kullanan temsili iki gen testi kullanılarak bir lottan lota kesinlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Her FFPE numunesi iki benzersiz mutasyon içermiştir: bir tane düşük (yaklaşık %8) mutasyon frekans düzeyinde ve bir tane yüksek (yaklaşık %14) mutasyon frekans düzeyinde. Üç reaktif kit lotu ile ardışık olmayan üç gün boyunca beş numune karışımının her birinin on iki (12) gözlemi toplanmıştır. Çalışma için tüm reaktif lotlarında toplam gözlem sayısı, tüm numune karışımları boyunca 180 gözlem ve tüm mutasyon frekans düzeyleri boyunca 360 gözlem olmuştur. Tüm lot ve günler boyunca, gözlemlerin %99,7'si (359/360) beklenen mutasyon sonucunu göstermiştir. Bir düşük frekans mutasyonu yanlışlıkla yabancı tip olarak aranmıştır. Sistemin değişkenliğini tahmin etmek için, mutasyonlar/mutasyon frekans düzeylerinin her biri için bir varyans bileşen analizi gerçekleştirilmiştir. Toplam standart sapma 0,011 ile 0,029 arasında olmuştur. Toplam standart sapmanın reaktif lotu bileşeni 0 ile 0,015 arasında olmuştur.

Revizyon Geçmişi

Belge No.	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No. 200006218 v02	Ekim 2023	Sürüm 4 için Local Run Manager'a yapılan referanslar güncellendi. Avustralya sponsor bilgilerini eklemek için etiket güncellendi. Kullanma talimatının MiSeqDx için Cihaz doğrulama çalışma raporundan farklı olduğu durumlardaki tutarsızlıklar düzeltildi.
Belge No. 200006218 v01	Mayıs 2022	Zorunlu Olmayan Sağlanan Ekipman ve Malzemelere MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro Kullanma Talimatı CN eklendi MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro için test bilgileri Performans Özelliklerine eklendi. Uyarılar ve Önlemler'den ABD'ye özgü dikkat notu çıkarıldı.
Belge No. 200006218 v00	Kasım 2021	MOS v4.0 ve Local Run Manager v3.0.ı desteklemek için ilk sürüm.

Patentler ve Ticari Markalar

Bu belge ve içindekiler Illumina, Inc. ve bağlı şirketlerinin ("Illumina") mülkiyetinde olup yalnızca işbu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin kullanımıyla bağlantılı olarak müşterisinin sözleşmeye ilişkin kullanımı içindir. Bu belge ve içindekiler Illumina'nın önceden yazılı izni olmaksızın başka hiçbir amaçla kullanılamaz veya dağıtılamaz ve/veya hiçbir şekilde iletilemez, ifşa edilemez ya da kopyalanamaz. Illumina bu belge ile patenti, ticari markası, telif hakkı veya genel hukuk hakları ya da üçüncü tarafların benzer hakları kapsamında hiçbir lisansı devretmez.

Bu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin uygun ve güvenli bir şekilde kullanılması için nitelikli ve uygun eğitim almış çalışanlar bu belgedeki talimatları tam olarak ve açık bir şekilde uygulamalıdır. Söz konusu ürün/ürünler kullanılmadan önce bu belgedeki tüm bilgiler tam olarak okunmalı ve anlaşılmalıdır.

BU BELGEDE YER ALAN TÜM TALİMATLARIN TAMAMEN OKUNMAMASI VE AÇIK BİR ŞEKİLDE UYGULANMAMASI, ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN HASAR GÖRMESİNE, KULLANICI VEYA BAŞKALARI DAHİL OLMAK ÜZERE KİŞİLERİN YARALANMASINA VE DİĞER MALLARIN ZARAR GÖRMESİNE NEDEN OLABİLİR VE ÜRÜN/ÜRÜNLER İÇİN GEÇERLİ OLAN HER TÜRLÜ GARANTİYİ GEÇERSİZ KILACAKTIR.

ILLUMINA BU BELGEDE AÇIKLANAN ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN (ÜRÜNÜN PARÇALARI VE YAZILIMI DAHİL) YANLIŞ KULLANIMINDAN DOĞAN DURUMLARDAN SORUMLU TUTULAMAZ.

© 2023 Illumina, Inc. Tüm hakları saklıdır.

Tüm ticari markalar Illumina, Inc. veya ilgili sahiplerinin malıdır. Özel ticari marka bilgileri için www.illumina.com/company/legal.html sayfasına başvurun.

İletişim Bilgileri



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 ABD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (Kuzey Amerika dışından)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE

IVD

EC REP



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

Avustralya Sponsoru

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

Ürün Etiketi

Ürün ambalajı ve etiketinde görülebilecek sembollere dair eksiksiz referans için support.illumina.com adresinden kitinize yönelik *Documentation* (Belge) sekmesindeki sembol anahtarına bakın.