

Kullanım Talimatı

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

Katalog No 20005715

Kullanım Amacı

NextSeq 550Dx instrument, *in vitro* tanı testleri ile birlikte kullanıldığında DNA Kütüphanelerini sekanslamak üzere tasarlanmıştır. NextSeq 550Dx instrument cihazı spesifik olarak tescilli, sertifikalı veya onaylı *in vitro* tanı reaktifleri ve analitik yazılım ile kullanım içindir.

Prosedür İlkeleri

Illumina NextSeq 550Dx instrument cihazı, *in vitro* tanı testleri ile DNA kütüphanelerini sekanslamak üzere tasarlanmıştır ve klinik laboratuvarlarda gerçekleştirilen *in vitro* tanı prosedürlerinin kullanımı konusunda eğitim almış, nitelikli ve eğitilmiş klinik laboratuvar personeli tarafından kullanılması amaçlanmıştır. NextSeq 550Dx girdi için, numune dizinlerinin ve yakalama sekanslarının amplifiye hedeflere eklendiği, DNA'dan oluşturulan kütüphaneleri kullanır. Numune kütüphaneleri bir akış hücrelerinde yakalanır ve sentezle sekanslama (SBS) kimyasıyla cihaz üzerinde sekanslanır. SBS kimyası, büyüyen DNA zincirlerine kaynaştıkça floresan etiketlemeli 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, baz aramaları işlemek üzere cihaz üzerinde ikincil analiz yürütülebilir. NextSeq 550Dx iş akışına bağlı olarak farklı ikincil analiz modülleri kullanır. Germ Hattı Varyantı veya Somatik Varyant Modülü için, işlemeye çoğullama çözme, FASTQ dosyası oluşturma, hizalama, varyant arama ve varyant arama biçimi (VCF ve gVCF) dosyalarını oluşturma dahildir. VCF ve gVCF dosyaları, bir referans genomdaki spesifik konumlarda bulunan varyanlara ilişkin bilgileri içerir.

Çift Önyükleme Yapılandırması

NextSeq 550Dx, cihazın tanı (Dx) veya sadece araştırma kullanımı (RUO) modunda kullanılabilmesini sağlamak üzere çift önyükleme yapılandırması içerir. Germ Hattı Varyantı ve Somatik Varyant Modülü dahil olmak üzere *in vitro* tanı sekanslama testleri tanı modunda yürütülür. Tanı modunda yalnızca IVD sekanslama reaktifleri kullanılabilir. NextSeq 550Dx instrument'a ilişkin performans özellikleri ve prosedür kısıtlamaları Germ Hattı Varyantı ve Somatik Varyant Modüllerinin tanı modunda kullanılmasıyla belirlenmiştir.

Prosedür Kısıtlamaları

1. *In Vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.
2. Germ Hattı ve Somatik Varyant Modülü, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) veya NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) ile birlikte kullanıldığında aşağıdakileri sunma kapasitesine sahiptir:
 - Sekanslama çıktısı ≥ 90 gigabaz (Gb)
 - Okuma uzunluğu (çift sonlu çalıştırmada) 2 x 150 baz çifti (bp)
 - 2 x 150 baz çifti (bp) okuma uzunluğunda ≥ 75 Q30'a eşit veya daha yüksek olan bazlar
Bazların %75'i veya daha fazlası Phred ölçeğinde ≥ 30 kalite skoruna sahiptir ve bu, %99,9'dan yüksek baz arama doğruluğu anlamına gelir
3. İçerik uzunluğunun > 25 baz çifti (bp) olduğu insersiyon/delesyonlar (insersiyonlar, delesyonlar veya kombinasyonlar) içeren okumalar, test yazılımı tarafından hizalanmaz. Sonuç olarak, > 25 baz çifti (bp) uzunluğundaki insersiyon/delesyonlar test yazılımı tarafından saptanamaz.
4. Test yazılımı, amplikon okumalarını uç varyant içeriği ile hizalamayabilir ve bu durum, bölgenin yabancı tip olarak raporlanmasına neden olabilir. Bu tür uç içerikler şunları içerir:
 - Üçten fazla insersiyon/delesyon içeren okumalar
 - Toplam amplikon hedef uzunluğunun > %4'ü kadar tek nükleotid varyantı (SNV) içeriği bulunan en az 30 baz çifti (bp) uzunluğundaki okumalar (prob bölgeleri hariç)
 - Toplam amplikon uzunluğunun < %10'u kadar SNV içeriği bulunan > 30 baz çifti (bp) uzunluğundaki okumalar (prob bölgeleri dahil)
5. Çoklu nükleotid varyantları (MNV) ve büyük insersiyon/delesyonlar dahil olmak üzere büyük varyantlar, çıktı VCF dosyasında ayrı ayrı daha küçük varyantlar olarak raporlanabilir.
6. Delesyon uzunluğu bölünmüş amplikonların arasındaki üst üste gelen kısımdan büyük veya bu kısma eşitse iki bölünmüş amplikon yayılırken delesyon varyantları filtrelenebilir veya kaçırılabilir.
7. İnsersiyon/delesyon doğrudan bir primerin bitişiğinde meydana gelirse ve üst üste gelen bir amplikon yoksa sistem insersiyon/delesyonları saptayamaz. Üst üste gelen amplikonların bulunduğu bölgelerde, üst üste gelme bölgesi saptanacak delesyon boyutundan küçük olduğunda test delesyonları saptayamaz. Örneğin, iki bitişik amplikon arasındaki üst üste gelme iki bazsa test bu bazların her ikisini içeren hiçbir delesyonu saptayamaz. Bu bazlardan birinde meydana gelen tek baz delesyonu ise saptanabilir.
8. Tüm hibridizasyon temelli kütüphane hazırlama iş akışlarında olduğu gibi oligonükleotid bağlama bölgelerindeki altta yatan polimorfizmler, mutasyonlar, insersiyonlar veya delesyonlar alellerin problemlenmesini ve sekanslama sırasında yapılan aramaları etkileyebilir. 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.
9. İnsersiyon/delesyonlar, bir okumanın sonunda meydana geliyorsa ve hizalama sırasında yazılım tarafından kesiliyorsa zincir biası nedeniyle filtrelenebilirler.
10. Küçük MNV'ler doğrulanmamıştır ve yalnızca Somatic Variant Module'de raporlanır.
11. Delesyonlar VCF'de, VCF biçimine göre önceki bazın koordinatında raporlanır. Dolayısıyla, bağımsız bir baz aramayı homozigot referans olarak raporlamadan önce bitişik varyantları değerlendirin.
12. Germ hattına özgü kısıtlamalar:
- NextSeq 550Dx için Local Run Manager Germ Hattı Varyantı Modülü kullanılan NextSeq 550Dx instrument cihazı, germ hattı varyant aramaları için kalitatif sonuçlar sunmak üzere tasarlanmıştır (ör. homozigot, heterozigot, yabani tip).
 - Germ Hattı Varyantı Modülü ile birlikte kullanıldığında doğru varyant araması için gereken ampikon başına minimum kapsam 150x şeklindedir. Sonuç olarak 150 destekleyici DNA parçası gereklidir ve bu, 300 adet üst üste gelen çift sonlu okumaya eşdeğerdir. 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 dokuz tekrar olması gerekir. Yalnızca en fazla 5 baz çifti (bp) uzunluğundaki tekrarlar değerlendirilir (R5x9).
 - Tek loküste bir SNV ve insersiyon/delesyon olması yalnızca bir varyantın raporlanmasına yol açabilir.
13. Somatiğe özgü kısıtlamalar.
- NextSeq 550Dx için Local Run Manager Somatik Varyant Modülünü kullanan NextSeq 550Dx instrument cihazı, 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 bulunması).
 - Somatic Variant Module ile birlikte kullanıldığında doğru varyant araması için gereken ampikon başına minimum kapsam, oligonükleotid havuzu başına 450x şeklindedir. Sonuç olarak oligonükleotid havuzu başına 450 destekleyici DNA parçası gereklidir ve bu, 900 adet üst üste gelen çift sonlu okumaya eşdeğerdir. Numune sayısı ve hedeflenen toplam baz sayısı kapsamı etkiler. GC içeriği ve diğer genom içeriği, kapsamı etkileyebilir.
 - Somatik varyant aramasında, varyantın filtrelenmesi için referansta en az altı tekrar olması gerekir ve yalnızca en fazla 3 baz çifti (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 NextSeq 550Dx aşağıdakilerden oluşur:

1. NextSeq 550Dx instrument (Katalog No 20005715)
2. NextSeq 550Dx instrument için yazılım bileşenleri aşağıdakileri içerir:

Yazılım Uygulaması	İşlev	Açıklama
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Cihaz çalışmasını denetler	NOS yazılım uygulaması, sekanslama esnasında cihazın çalışmasını yönetir ve Real-Time Analysis (RTA) yazılımı tarafından kullanılmak üzere görüntüler oluşturur.
Real-time Analysis Software (RTA)	Birincil analizi gerçekleştirir	RTA yazılım uygulaması, sekanslama çalıştırmasının her bir döngüsünde her kutucuk için NOS 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, uygun analiz modünü seçme ve durum izleme için cihaz üzerinde entegre bir çözümdür.
Somatic Variant Module	İkincil analizi gerçekleştirir	Bu Local Run Manager analiz modülü yazılımı, ikincil analiz yoluyla baz aramaları işler. İşleme kapsamında çoğullama çözme, FASTQ dosyası oluşturma, hizalama, varyant arama ve raporlama yer alır. Varyant arayıcı (Pisces), bir referans genomunda belirli konumlarda bulunan varyantlar hakkında bilgiler içeren VCF dosyalarını oluşturur ve ölçülen varyant frekansını içerir.
Germline Variant Module	İkincil analizi gerçekleştirir	Bu Local Run Manager analiz modülü yazılımı, ikincil analiz yoluyla baz aramaları işler. İşleme kapsamında çoğullama çözme, FASTQ dosyası oluşturma, hizalama, varyant arama ve raporlama yer alır. Varyant arayıcı (Pisces), bir referans genomunda belirli konumlarda bulunan varyantlar hakkında bilgiler içeren VCF dosyalarını oluşturur ve her varyantı heterozigot veya homozigot olarak belirler.

3. **İsteğe bağlı** illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx (Katalog # 20086130), aşağıdaki yazılım bileşeni dahil:

Yazılım Uygulaması	İşlev	Açıklama
Illumina Run Manager	Uygulama modülü seçimi için arayüz	Illumina Run Manager yazılımı isteğe bağlı, cihaz dışı DRAGEN server'a kurulur. Illumina Run Manager, kullanıcı yönetimi, analiz modülü seçimi ve sıralama çalışması ve analiz durumunun izlenmesini sağlar.

İsteğe bağlı Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx yalnızca belirli ülkelerde mevcuttur. Bölgenizde mevcut olup olmadığını öğrenmek için Illumina temsilcisi ile iletişime geçin.

Çalışma Koşulları

Çalışma koşulları hakkında daha fazla bilgi için *NextSeq 550Dx Instrument Tesis Hazırlama Kılavuzu (Belge No. 1000000009869)*, Çevresel Hususlar bölümüne bakın.

Element	Spesifikasyon
Sıcaklık	Laboratuvar sıcaklığının 19 °C ila 25 °C (22 °C ±3 °C) aralığında olmasını sağlayın. Bu sıcaklık, cihazın çalışma sıcaklığıdır. Çalışma esnasında ortam sıcaklığı değişiminin ±2 °C'den daha fazla olmasına izin vermeyin.
Nem	Yoğunlaşmayan bağıl nemin %20–80 olmasını sağlayın.

En son güvenlik yönergeleri, uyarılar ve Illumina sistemlerine ilişkin bilgi için Illumina [Güvenlik ve Ağ Oluşturma](#) bölümüne başvurun.

Ekipman ve Materyaller

Gereken ve Ayrı Satılan Ekipman ve Materyaller

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 döngü), Katalog No. 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü), Katalog No. 20028871

Gerekli Ekipmanlar ve Materyaller, Temin Edilmeyen

Sekanslama Çalıştırmaları için Kullanıcı Tarafından Tedarik Edilen Sarf Malzemeleri

Sarf Malzemesi	Tedarikçi	Amaç
Alkollü mendiller, %70 İzopropil veya Etanol, %70	VWR, katalog no 95041-714 (veya eşdeğeri) Genel laboratuvar tedarikçisi	Akış hücrelerini temizleme ve genel amaçlı
Laboratuvar mendili, çok hav bırakmayan	VWR, katalog no 21905-026 (veya eşdeğeri)	Akış hücrelerini temizleme ve genel amaçlı

Cihaz Bakımı için Kullanıcı Tarafından Tedarik Edilen Sarf Malzemeleri

Sarf Malzemesi	Tedarikçi	Amaç
NaOCl, %5 (sodyum hipoklorit)	Sigma-Aldrich, katalog no 239305 (veya laboratuvar sınıfı eşdeğeri)	Çalıştırma sonrası manuel yıkama ile cihazı yıkama; %0,12'ye seyreltilir
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalog no P7949	Manuel yıkama seçenekleri ile cihazı yıkama; %0,05'e seyreltilir
Su, laboratuvar sınıfı	Genel laboratuvar tedarikçisi	Cihazı yıkama (manuel yıkama)
Hava filtresi	illumina, katalog no 20063988	Cihazın soğutma için aldığı havayı temizleme

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 Megohm (MΩ) su
- Milli-Q su
- Super-Q su
- Moleküler biyoloji sınıfı su

Uyarılar ve Tedbirler



DİKKAT

Federal yasalar, bu cihazın kullanılmak ya da kullanılmasını sipariş etmek üzere yalnızca hekimler ya da faaliyet gösterdiği Eyalet kanunlarınca lisanslı olan diğer pratisyen hekimler tarafından veya bu hekimlerin siparişi üzerine satılması yönünde kısıtlama getirmektedir.

- NextSeq 550Dx instrument ile birlikte kullanılmak üzere Illumina tarafından sağlanan bazı bileşenler potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içermektedir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması hâlinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. 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 Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.
- 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).
- Dizin-numune çifti, yazdırılan plaka düzeni ile tam olarak eşleşmelidir. Local Run Manager modüle girildiklerinde numune adlarıyla 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.
- NextSeq 550Dx 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.

11. Cihaz yaklaşık 185 lb ağırlığındadır ve düşürülmesi ya da hatalı şekilde taşınması durumunda ciddi yaralanmalara neden olabilir.
12. Illumina, siber güvenlik tehditlerini yönetmeye yönelik devam eden ihtiyacın farkındadır; sistemlere ilişkin en son güvenlik rehberliği, uyarılar ve bilgiler için Illumina bkz. [Güvenlik ve Ağ Oluşturma](#).

Kullanım Talimatları

Aşağıdaki NextSeq 550Dx instrument kullanma talimatı NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) veya NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 döngü) içinde sağlanan reaktiflerin temin edilmesini gerektirir.

Çalıştırma Oluştur

Local Run Manager veya Illumina Run Manager kullanarak bir sekanslama çalıştırması oluşturun. Local Run Manager için kullanım talimatları NextSeq 550Dx Instrument Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513) içinde verilmiştir. Illumina Run Manager kullanarak bir çalışmanın nasıl oluşturulacağına ilişkin talimatlar için bkz. Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx Yazılım Kılavuzu (belge no. 200025239).

Local Run Manager veya Illumina Run Manager arasında nasıl seçim yapılacağı da dahil olmak üzere kullanımına ilişkin talimatlar için bkz. Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx Yazılım Kılavuzu (belge no. 200025239). Spesifik uygulamalarla ilgili ayrıntılı talimatlar için spesifik testin modülüne veya uygulama kılavuzuna bakın. Aşağıdaki talimatlar Local Run Manager Germ Hattı ve Somatik Varyant modüllerinin kullanımıyla ilgilidir.

Parametreleri Ayarlama

1. Local Run Manager'da oturum açın.
2. **Create Run** (Çalıştırma Oluştur) seçeneğini ve ardından **Somatic Variant** (Somatik Varyant) veya **Germline Variant** (Germ Hattı Varyant) seçeneğini belirleyin.
3. Çalıştırmayı sekanslamadan analize kadar tanımlayan bir çalıştırma adı girin. Alfanumerik karakterler, boşluklar, alt çizgiler veya kesik çizgiler kullanın.
4. [İsteğe bağlı] Çalıştırmayı tanımlamaya yardımcı olması için bir çalıştırma açıklaması girin. Alfanumerik karakterler, boşluklar, alt çizgiler veya kesik çizgiler kullanın.
5. Açılır listeden numune sayısı ve dizin setini seçin. Bir seçim yaparken aşağıdaki bilgileri göz önünde bulundurun.
 - Açılır liste, dizin seti olan örnek sayısını içerir. Örneğin, 24-Set 1, indeks seti 1'den indekslerle test edilecek 24 numuneyi gösterir.
 - Dizin seti numaraları, i5 ve i7 indeks çiftlerinin farklı setlerini ifade eder. Set 1 ve Set 2'nin her ikisi de indeks çeşitliliği sağlar. Tek bir setin tükenmesini önlemeye yardımcı olmak için iki indeks seti sunulmaktadır.

- Test ettiğiniz örnek sayısına en yakın örnek sayısını seçin. Tam örnek sayısı listede yoksa, en yakın sayıyı seçin, ancak test ettiğiniz sayıdan azını seçin. Örneğin, 18 numuneyi test etmek istiyorsanız, 16 numune seçin.
- İndeks çeşitlilik gerekliliklerini karşılayan önerilen örnek kuyucukları ve indeks kombinasyonları yeşil renkle vurgulanır.

Çalıştırma İçin Belirtim Dosyalarını İçe Aktarma

1. İçe aktarmak istediğiniz belirtilerin erişilebilir bir ağ konumunda veya bir USB sürücüsünde olduğundan emin olun.
2. **Import Manifests** (Belirtimleri İçe Aktar) ögesini seçin.
3. Belirtim dosyasına gidin ve eklemek istediğiniz belirtileri seçin.

NOT Germ Hattı Varyantı ya da Somatik Varyant analiz modülünün kullanıldığı tüm çalıştırmalar için belirtim dosyalarını kullanılabilir duruma getirmek için Module Settings (Modül Ayarları) özelliğini kullanarak belirtileri ekleyin. Bu özellik için yönetici kullanıcı düzeyinde izinler gereklidir. Daha fazla bilgi için bkz. *NextSeq 550Dx Instrument Referans Kılavuzu (belge no 100000009513)*

Çalıştırma İçin Numuneleri Belirleme


Aşağıdaki talimat ve seçeneklerden birini kullanarak çalıştırma için numuneleri belirleyin.

Numuneleri manuel olarak girme—Create Run (Çalıştırma Oluştur) ekranındaki boş tabloyu kullanın.


Numuneleri içe aktarma—Virgülle ayrılmış değerler (*.csv) biçimindeki bir harici dosyaya gidin. Create Run (Çalıştırma Oluştur) ekranında indirmek için bir şablon mevcuttur.

Numuneleri Manuel Olarak Girme

1. Benzersiz bir numune adı (*Somatic Variant analiz modülü*) veya numune numarası (*Germline Variant analiz modülü*) girin.
Alfanumerik karakterler, kesik çizgiler veya alt çizgiler kullanın.
2. [İsteğe bağlı] Pozitif veya negatif kontrol numuneleri için, sağ tıklayın ve kontrol türünü seçin.
Bir numune kuyusundaki kontrol, diğer havuzda karşılık gelen kuyuyu otomatik olarak aynı kontrol ile doldurur.
3. [İsteğe bağlı] Sample Description (Numune Açıklaması) alanına numune açıklaması girin.
Alfanumerik karakterler, kesik çizgiler veya alt çizgiler kullanın.
4. Index 1 (i7) (Dizin 1 (i7)) açılır listesinden bir Dizin 1 adaptörü seçin.
Önerilen numune kuyularını kullandığınızda yazılım, dizin çeşitliliği gerekliliklerini karşılayan i7 ve i5 dizin adaptörlerini otomatik olarak doldurur. Listedeki tam olarak test ettiğiniz sayıda numune yer almıyorsa mutlaka ekstra kuyular için dizin adaptörleri seçin.

- Index 2 (i5) (Dizin 2 (i5)) açılır listesinden bir Dizin 2 adaptörü seçin.
- Manifest (Belirtim) açılır listesinden bir belirtim dosyası seçin.
Havuz A'daki numuneler Havuz B'deki numunelerden farklı bir belirtim gerektirir.
- Plaka düzenini görüntülemek, yazdırmak veya kütüphane hazırlığı için bir referans olarak kaydetmek için bir seçenek belirleyin:
 - Plaka düzenini görüntülemek için  **Print** (Yazdır) simgesini seçin. Plaka düzenini yazdırmak için **Print** (Yazdır) seçeneğini belirleyin.
 - Numune bilgilerini harici dosyaya dışa aktarmak için **Export** (Dışa Aktar) ögesini seçin.
- Save Run** (Çalıştırmayı Kaydet) ögesini seçin.

Numuneleri İçe Aktarma

- Import Samples** (Numuneleri İçe Aktar) seçeneğine tıklayın ve numune bilgileri dosyasının konumuna gidin. İçe aktarabileceğiniz iki tür dosya vardır.
 - Yeni bir plaka düzeni oluşturmak için Create Run (Çalıştırma Oluştur) ekranında **Template** (Şablon) ögesini seçin. Şablon dosyası içe aktarma için doğru sütun başlıklarını içerir. Çalıştırmadaki numuneler için her sütuna numune bilgilerini girin. Kullanılmayan hücrelerdeki örnek bilgileri silin ve ardından dosyayı kaydedin.
 - Export (Dışa Aktar) özelliği kullanılarak Germ Hattı Varyantı veya Somatik Varyant modülünden dışa aktarılmış numune bilgileri dosyasını kullanın.
- Plaka düzenini görüntülemek için  **Print** (Yazdır) simgesini seçin.
- Kütüphaneleri hazırlama referansı olarak plaka düzenini yazdırmak için **Print** (Yazdır) ögesini seçin.
- Save Run** (Çalıştırmayı Kaydet) ögesini seçin.

Reaktif Kartuşunu Hazırlama

Başarılı bir sekanslama için reaktif kartuşu talimatlarına uyduğunuzdan emin olun.

- Reaktif kartuşunu -25 °C ila -15 °C depodan çıkarın.
- Reaktifleri çözdürmek için aşağıdaki yöntemlerden birini seçin. Kartuşu sıvıya batırmayın. Kartuşun çözdürülmesinin ardından sonraki adıma geçmeden önce kartuşu kurutun.

Sıcaklık	Çözdürme Süresi	Stabilite Sınırı
15 °C ila 30 °C su banyosu	60 dakika	En fazla 6 saat
2 °C ila 8 °C	7 saat	En fazla 5 gün

NOT Aynı su banyosunda birden fazla kartuşun buzu çözdürülüyorsa çözdürme işlemi için ek süre tanıyın.

- Reaktifleri karıştırmak için kartuşu beş kez ters çevirin.

4. Reaktiflerin buzunun çözdürüldüğünden ve çökelti kalmadığından emin olmak için kartuşun alt kısmını inceleyin. En büyük boyutlular ve çözdürülmesi en uzun süreler olduklarından 29, 30, 31 ve 32 numaralı konumların buzunun çözdürüldüğünü teyit edin.
5. Hava kabarcıklarını azaltmak için nazikçe tezgaha vurun.
En iyi sonuçlar için doğrudan numuneyi yüklemeye ve çalıştırmayı ayarlamaya geçin.

Akış Hücrelerini Hazırlama

1. Yeni bir akış hücresi kutusunu 2 °C ila 8 °C depodan çıkarın.
2. Folyo ambalajı kutudan çıkarın ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletin.

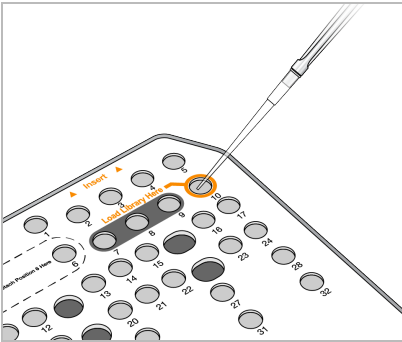
Sekanslama için Kütüphane Hazırlama

Kütüphanelerinizi 1,3 ml yükleme hacmine denşirin ve seyreltin. Uygulama bakımından yükleme konsantrasyonu, kütüphane hazırlama ve miktar tayini yöntemlerine göre farklılık gösterebilir. Numune kütüphanelerinin seyreltilmesi, oligonükleotid havuzlarının karmaşıklık düzeyine bağlıdır. Kütüphane seyreltme ve havuzlama dahil olmak üzere sekanslama için numune kütüphanelerini hazırlama talimatları için ilgili kütüphane hazırlama kitinin Kullanım Talimatları bölümüne bakın. NextSeq 550Dx cihazında küme yoğunluğunun optimize edilmesi gereklidir.

Reaktif Kartuşuna Kütüphane Yükleme

1. Çok hav bırakmayan bir mendil ile **Load Library Here** (Kitaplığı Buraya Yükle) etiketli 10 numaralı hazneyi kaplayan folyo kapağı temizleyin.
2. Kapağı temiz bir 1 ml pipet ucu ile delin.
3. Hazırlanan kütüphanelerden 1,3 ml'yi **Load Library Here** (Kitaplığı Buraya Yükle) etiketli 10 numaralı hazneye yükleyin. Kütüphaneleri dağıtırken folyo kapağa dokunmayın.

Şekil 1 Kütüphaneleri Yükleme



Sekanslama Çalışması Ayarlama

Tüm çalışma NextSeq 550Dx Instrument Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513) kurulum talimatları için bkz.

1. Local Run Manager veya Illumina Run Manager yazılım parolanız ile NextSeq 550Dx instrument'ta oturum açın.
2. NOS yazılımının Ana ekranından **Sequence** (Sekans) seçeneğini belirleyin.
3. Listedenden bir çalıştırma seçin ve ardından **Next** (Sonraki) ögesini seçin.
Bir dizi çalışma kurulum ekranı aşağıdaki sırayla açılır: Akış Hücrelerini Yükle, Tampon Kartuşunu Yükle, Reaktif Kartuşunu Yükle ve Çalışma Öncesi Kontrol.

NOT Sonuçlara yalnızca çalıştırmayı planlarken kullanılan aynı çalıştırma yöneticisi kullanılarak erişilebilir. Run Manager Yazılımının nasıl ayarlanacağına ilişkin talimatlar için bkz. Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx Yazılım Kılavuzu (belge no. 200025239).

4. Load Flow Cell (Akış Hücreleri Yükleme) ekranı görüntülediğinde, akış hücrelerini temizleyin ve yükleyin.
 - Akış hücrelerini folyo ambalajdan çıkarın.
 - Şeffaf plastik çift çeneli ambalajı açın ve akış hücrelerini çıkarın.
 - Akış hücrelerinin cam yüzeyini hav bırakmayan bir alkollü bezle temizleyin. Camı çok hav bırakmayan bir laboratuvar mendili ile kurulayın
 - Akış hücrelerinin cam yüzeyinin temiz olduğundan emin olun. Gerekirse temizlik adımını tekrarlayın.
 - Önceki bir çalıştırmadan kullanılmış akış hücrelerini çıkarın.
 - Akış hücrelerini hizalama pimlerinin üzerinden hizalayın ve akış hücrelerini kızağa yerleştirin.
5. **Load** (Yükle) seçeneğini belirleyin.
Kapak otomatik olarak kapanır, ekranda akış hücreleri numarası görüntülenir ve sensörler kontrol edilir.
6. Yazılım istemlerini uygulayarak kullanılmış reaktif şişesini boşaltın, NextSeq 550Dx tampon kartuşunu yükleyin ve NextSeq 550Dx reaktif kartuşunu yükleyin.
NextSeq 550Dx tampon ve reaktif kartuşları yüklendiğinde yazılım RFID'yi okur ve kaydeder. Tampon ve reaktif kartuşu numaraları ekranda görüntülenir ve sensörler denetlenir.
7. Çalıştırma öncesi otomatik denetim tamamlandığında **Start** (Başlat) ögesini seçin. (Otomatik olarak başlatılmak üzere yapılandırılmışsa gerekmez.)
8. 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 tamamlandığında seçilen uygulama modülü otomatik olarak ikincil analizi başlatır. Burada açıklanan ikincil analiz işlemleri NextSeq 550Dx instrument cihazındaki Local Run Manager Germ Hattı ve Somatik Varyant Modülleri için geçerlidir.

Çoğullama çözme

Çoğullama çözme, her Dizin Okuması sekansını çalıştırma için belirtilen dizin sekansları ile kıyaslar. Bu adım için herhangi bir kalite değeri dikkate alınmaz.

Dizin okumaları aşağıdaki adımlar kullanılarak belirlenir:

- Numuneler çalıştırma için listelendikleri sıralamaya göre 1'den başlayarak numaralandırılır.
- Numune numarası 0, bir numuneye atanmamış kümeler için ayrılmıştır.
- Kümeler, dizin sekansı tam olarak eşleştiğinde veya Dizin Okuması başına tek bir uyumsuzluk olduğunda bir numuneye atanır.

FASTQ Dosyası Oluşturma

Çoğullama çözme sonrasında yazılım, sekansları temsil etmek için kullanılan bir metin biçimi olan FASTQ biçiminde ara analiz dosyaları oluşturur. FASTQ dosyaları her bir numune için okumaları ve ilişkili kalite skorlarını içerir. Filtreden geçmeyen kümeler hariç tutulur.

Her FASTQ dosyası yalnızca bir numune için okumaları içerir ve bu numunenin adı FASTQ dosya adında yer alır. Germ Hattı ve Somatik Varyant Modüllerinde, oligo pool (oligo havuzu) başına olan örnek başına sekiz FASTQ dosyası oluşturulur; bunların dördü Okuma 1'den ve dördü Okuma 2'dendir. Bu çıktı, Germ Hattı Varyantı ve Somatik Varyant için, numune başına, sırasıyla toplam 8 ve 16 FASTQ dosyası ile sonuçlanır. FASTQ dosyaları hizalama için birincil girdidir.

Hizalama

Hizalama adımında, bantlı Smith-Waterman algoritması her numuneden kümeleri belirtim dosyasında belirlenmiş amplikon sekanslarına hizalar.

Bantlı Smith-Waterman algoritması, iki sekans arasındaki benzer bölgeleri belirlemek için yarı global sekans hizalamaları gerçekleştirir. Bütün sekansı karşılaştırmak yerine, Smith-Waterman algoritması tüm olası uzunluklardaki segmentleri karşılaştırır.

Her çift sonlu okuma, söz konusu okuma için ilgili prob sekanslarına göre hizalanması açısından değerlendirilir.

- Okuma 1, Akış Aşağı Loküse Özgü Oligoların (DLSO) reverse tamamlayıcısına göre değerlendirilir.
- Okuma 2, Akış Yukarı Loküse Özgü Oligolara (ULSO) göre değerlendirilir.
- Bir okumanın başlangıcı, en fazla bir farkla bir prob sekansıyla eşleşirse o sekans için okumanın tam uzunluğu amplikon hedefine göre hizalanır.
- Bir okumanın başlangıcı, en fazla üç farkla (baştaki insersiyon/delesyonlardan kaynaklanan uyumsuzluklar veya kaymalar) bir prob sekansıyla eşleşirse o sekans için okumanın tam uzunluğu amplikon hedefine göre hizalanır.
- DLSO ve ULSO içindeki insersiyon/delesyonlar test kimyası dolayısıyla gözlemlenmez.

Hizalamalar, amplicon uzunluğuna bağlı olarak ilgili bölge veya tam amplicon üzerindeki uyumsuzluk oranlarına dayalı olarak hizalama sonuçlarından filtrelenir. Filtrelenen hizalamalar, hizalama dosyalarına hizalanmamış olarak yazılır ve varyant aramalarında kullanılmaz.

Varyant Arama

Varyant arayıcı Pisces, cihaz için hazırlanmış kütüphanelerden SNV ve insersiyon/delesyon varyant aramaları yapmak için tasarlanmıştır.

Raporlar ve Ek Çıktı Dosyaları

Varyant analiz modülleri, sekanslama derinliği ve varyant sayımı gibi metrikleri gösteren PDF ve sekmeyle ayrılmış (*.txt) raporlar oluşturur. Modüller aynı zamanda varyant arama uygulamaları için VCF ve genom Varyant Arama Biçimi (gVCF) dosyaları gibi çıktı dosyaları oluşturur.

Kalite Kontrol Prosedürleri

NextSeq 550Dx yazılımı her çalıştırma, numune ve baz aramayı kalite kontrol metriklerine göre değerlendirir. Kütüphane hazırlamada pozitif ve negatif kontroller tavsiye edilir ve bunların değerlendirilmesi gereklidir. Kontrolleri şu şekilde değerlendirir:

- **Negatif Kontrol (Şablonsuz Kontrol) veya diğer negatif kontrol**— Beklenen sonucu oluşturmalıdır. Negatif kontrol beklenenden farklı bir sonuç oluşturursa numune izlemede olası bir hata, dizinleme primerlerinin hatalı kaydı veya kontaminasyon meydana gelmiştir.
- **Pozitif Kontrol Numunesi**— Beklenen sonucu oluşturmalıdır. Pozitif kontrol beklenenden farklı bir sonuç oluşturursa numune izlemede olası bir hata veya dizinleme primerlerinin hatalı kaydı meydana gelmiştir.

Performans Özellikleri

NextSeq 550Dx instrument cihazına ilişkin performans özellikleri, TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ile Germ Hattı ve Somatik Varyant Modülü kullanılarak belirlenmiş ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kullanılarak doğrulanmıştır. Çalışmalar arasında Numune Dinleme, Numune Taşıma, DNA Girdisi, Analitik Duyarlılık (Kör Sınırı/Saptama Sınırı), Doğruluk, Kesinlik, Yöntem Karşılaştırma ve Tekrarlanabilirlik yer almıştır.

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kullanılan analitik çalışmalar, daha önce NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ile belirlenen performans iddialarını değerlendirmek üzere tasarlanmıştır. Sonuçlar, reaktif kitlerinin (v2 ve v2.5) TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanılarak karşılaştırılabilir nitelikte performans sağladığını göstermektedir. Ekstraksiyon yöntemleri veya enterferan maddeler gibi pre-analitik faktörler ile ilgili performans özellikleri için *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanım talimatı* belgesine bakın.

Performans Özelliklerinde Kullanılan Hesaplamaların Tanımları

1. Pozitif Yüzde Uyumu (PPA), testin doğru raporladığı ve referans yöntemine 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).
2. Negatif Yüzde Uyumu (NPA), testin doğru raporladığı ve referans yöntemine 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).
3. Genel yüzde uyumu (OPA), referans yöntemine nispeten test tarafından doğru raporlanmış loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $((\text{testin doğru şekilde raporladığı varyant loküsü sayısı}) + (\text{testin doğru şekilde raporladığı yabancı tip loküsü sayısı})) / ((\text{toplam varyant loküsü sayısı}) + (\text{toplam yabancı tip loküsü sayısı}))$
4. PPA, NPA ve OPA hesaplamaları 'arama yok' (no call) durumlarını (bir veya daha fazla kalite filtresini karşılamayan varyant veya referans loküsler) içermez.
5. Otozomal arama oranları, filtreden geçen toplam loküs sayısının, 1-22. kromozom için toplam sekanslanan konum sayısına bölünmesiyle hesaplanır; X ve Y kromozomları hariç tutulur. Bu metrik, aramaların referans yöntemle uyumunu dikkate almaz.

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Döngü) Performansı

Numune Dizinleme

Kütüphane hazırlama sırasında eklenen numune dizin primerleri her bir numune DNA'sına benzersiz bir sekans atar. Bu benzersiz sekanslar, birden çok numunenin tek bir sekanslama çalıştırmasında havuzlanabilmesini sağlar. Numune dizinleme hem germ hattı hem somatik iş akışları kullanılır. Bu çalışmanın amacı, NextSeq 550Dx instrument ile tek sekanslama çalıştırmasında işlenebilecek minimum (8) ve maksimum (96) numune sayısını belirlemektir. Sekiz benzersiz Platinum Genome numunesi, numune başına 12 farklı dizinleme primer kombinasyonu ile test edilmiştir. Germ Hattı Varyantı Modülü kullanılarak gerçekleştirilen dört sekanslama çalıştırmasından gelen numune sonuçları Platinum Genomes versiyon 2016-1.0 ile karşılaştırılmıştır.

İlk alıştırma kumesinde, testin belirli bir numune için farklı dizinleme primeri kombinasyonları arasında tutarlı bir Şekilde genotipleme araması yapma yeteneğini doğrulamak için 23 insan kromozomunun tamamında zincir başına 12.588 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulayacak Şekilde tasarlanmış temsili bir test ile 96 adet benzersiz dizinlenmiş numune kütüphanesi test edilmiştir. İkinci alıştırma kumesi için, desteklenen minimum dizin sayısını doğrulamak üzere sekiz adet benzersiz dizinlenmiş numune kütüphanesi iki sekanslama çalıştırmada sekanslanmıştır.

96 dizinli çalıştırmalarda, SNV'ler için PPA %98,7 ila %100, insersiyonlar ve delesyonlar için PPA %100 ve 96 dizin kombinasyonunun her biri için NPA %100 olmuştur. 8 dizinli çalıştırmalarda PPA değerleri %100 (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ve sekiz dizin kombinasyonunun her biri için NPA %100 olmuştur.

Numune Taşıma

NextSeq 550Dx instrument, tek bir sekanslama çalıştırmada birden fazla numunenin ve kontrolün sekanslanmasına olanak sağlar. Bir sekanslama alıştırması dahilinde (alıştırma içi) ve sekanslamalar arasında (alıştırmadan çalıştırmaya) numune taşıma kapsamını değerlendirmek üzere bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Biri erkek ve biri kadın olmak üzere iki Platinum Genome numunesi, her iki cinsiyet kromozomu dahil olmak üzere 23 farklı kromozom genelinde 12.588 bazı (150 amplikon) kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanmış temsili bir test ile test edilmiştir. Kütüphaneler, Germ Hattı Varyantı Modülü kullanılarak NextSeq 550Dx instrument'ta sekanslanmıştır. Erkek numunelerinin kadın numunelerine taşınması, kadın numunelerindeki Y kromozomu amplikon okumalarının varlığı ile gözlemlenmiştir.

alıştırma içi taşıma; küme oluşturma, dizin döngüsü baz arama ve numune oğullamasını çözme sırasında gerçekleşebilir. Sekanslama çalıştırmada numune taşımayı test etmek için, her bir erkek ve kadın numunesinin 46 kopyasından ve dört şablonsuz kontrolden oluşan bir kütüphane havuzu NextSeq 550Dx instrument'ta bir kez sekanslanmıştır. alıştırma içi numune taşıma, her bir kadın kopyasının Y kromozomu amplikon kapsamının, havuzdaki tüm erkek kopyalarının ortalama Y kromozomu amplikon kapsamı ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Gözlemlenen medyan alıştırma içi taşıma %0,084 olmuştur.

alıştırmadan çalıştırmaya numune taşıma testi için, iki kütüphane havuzu hazırlanmış ve ardışık olarak bir NextSeq 550Dx instrument'ta sekanslanmıştır. Birinci havuz, 46 kadın numunesi kopyası ve iki şablonsuz kontrol içermiştir. İkinci havuz, 46 erkek numunesi kopyası ve iki şablonsuz kontrol içermiştir. Her iki havuzda da aynı dizin adaptörleri kumesi kullanılmıştır. Kadın havuzu önce sekanslanmış, sonraki sekanslama alıştırması erkek havuzu ile gerçekleştirilmiş ve daha sonra tekrar başka bir kadın havuzu sekanslama alıştırması yapılmıştır. alıştırmadan çalıştırmaya numune taşıma, karşılık gelen kadın havuzu kopyalarının tekrar alıştırması ile erkek havuzu alıştırması arasındaki Y kromozomu amplikon kapsamı karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Gözlemlenen medyan çalıştırmadan çalıştırmaya taşıma %0,0076 olmuştur.

DNA Girdisi

Kan (Germ Hattı)

Germ Hattı Varyantı Modülü iş akışı ile TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kütüphane hazırlama için kan DNA'sı girdi aralığı NextSeq 550Dx instrument cihazı için belirlenmiştir. Bu aralık, 23 farklı kromozom genelinde 12.588 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanan temsili bir test ile 13 Platinum Genome numunesi kullanılarak bir seri seyreltme çalışması gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Kütüphane, bir NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) lotu kullanılarak iki NextSeq 550Dx instrument'ta sekanslanmıştır.

250 ng ile 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ve 12 ng) aralığındaki beş DNA girdisi düzeyinde beş adet numune iki kopya halinde test edilmiştir. Sekiz adet numune, beş DNA girdisi düzeyinin her birinde tek bir kopya halinde test edilmiştir. Doğruluğun belirlenmesi için, numune genotipleri Platinum Genomes versiyon 2016-1.0 ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar her bir giriş seviyesi için belirlenmiştir. Her bir varyant türüne (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ilişkin PPA [Tablo 1](#) kısmında; NPA ise [Tablo 2](#) kısmında sunulmaktadır. Tüm girdi düzeylerinde benzer doğruluk görülmüştür. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx için önerilen DNA girdisi 50 ng olup 25 ng ve 100 ng, performans özelliklerini karşılamak için alt ve üst sınırdır.

Tablo 1 Varyant Türüne Göre Her DNA Girdisi için PPA Sonuçları

DNA Girdisi (ng)	Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	İnsersiyon	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Delesyon	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tablo 2 Her DNA Girdisi için NPA

DNA Girdisi (ng)	TN	FP	Referans 'Arama Yok' (No Call) Durumları	NPA (%)
12	430940	4	26	>99,9

25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	>99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Somatik)

Somatic Variant Module iş akışı ile TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kütüphane hazırlama için formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş (FFPE) DNA girdisi aralığı NextSeq 550Dx instrument için belirlenmiştir. DNA girdisi aralığı, 23 farklı kromozom genelinde 12.588 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanan temsili bir test ile üç Platinum Genome numunesi kullanılarak bir seri seyreltme çalışması gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Platinum Genome hücre hatları GM12878 ve GM12877 formalinle fikse edilip parafine gömülmüş ve ardından DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. GM12878, 79 varyantın (55 SNV, 9 insersiyon ve 15 delesyon) varyant alel frekansları (VAF'ler) 0,025, 0,05 veya 0,10'a yakın olacak şekilde GM12877 ile seyreltilmiştir. Ek olarak her bir numune, en fazla 1,0 VAF olmak üzere daha yüksek varyant frekanslarına sahip 91 varyant içermiştir. Numuneler, TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit ile ölçüldüğü üzere ortalama delta kantitatif döngü (dCq) değeri 2,1, 3,6, 4,6, 6,0, ve 7,8 olan beş DNA girdisi düzeyinde iki kopya halinde işlenmiştir. Her kütüphane, iki NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) lotu kullanılarak iki NextSeq 550Dx instrument'ta sekanslanmıştır. Doğruluğun belirlenmesi için, numune varyantı aramaları Platinum Genomes versiyon 2016-1.0 ile karşılaştırılmıştır. Her bir varyant türüne (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ilişkin PPA [Tablo 3](#) kısmında; NPA ise [Tablo 4](#) kısmında sunulmaktadır. 0,05 VAF veya üzerindeki varyantlar için önerilen DNA girdisi dCq ≤ 4 olup 4,6, performans özelliklerini karşılamak için alt sınırdır.

Tablo 3 Varyant Türüne Göre Her DNA Girdisi için PPA Sonuçları

Ortalama dCq	Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	Beklenen No Call'lar	Hedef Seyreltme VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	PPA (%)	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	PPA (%)	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	PPA (%)
2,1	SNV	808	Geçerli değil.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100

2,1	İnsersiyon	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Delesyon	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tablo 4 Her DNA Girdisi İçin NPA

Ortalama dCq	Beklenen Yabani Tip	Hedef Seyreltme VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referans 'Arama Yok' (No Call) Durumları	NPA (%)	Referans 'Arama Yok' (No Call) Durumları	NPA (%)	Referans 'Arama Yok' (No Call) Durumları	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

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

Bu çalışma, NextSeq 550Dx instrument'ta Somatic Variant Module'e ilişkin Kör Sınırını (LoB) ve Saptama Sınırını (LoD) değerlendirmek için yapılmıştır. Bu çalışma, 23 farklı kromozom genelinde 12.588 bazı kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanmış temsili bir test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Platinum Genome hücre hatları GM12878 ve GM12877 formalinle fikse edilip parafine gömülmüş ve ardından DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. GM12878, 74 varyantın (53 SNV, 7 insersiyon ve 14 delesyon) varyant frekansları $0,05 \pm 0,02$ olacak şekilde GM12877 ile seyreltilmiştir. GM12877 ve seyreltilmiş GM12878 (GM12878-D), ardışık altı başlangıç günü boyunca tek bir cihazla, iki NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) lotu değiştirilerek toplam altı sekanslama çalıştırmasında test edilmiştir. Bu test, GM12878-D'deki her varyant için 60 kopya ve her reaktif lotu için GM12877'de karşılık gelen yabani tip koordinatı için 72 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 5). Somatic Variant Module, varyantların kalitatif saptamasını belirlemek için 0,026 VAF eşiği (etkin LoB) kullanır. Hesaplanan LoB, bu eşiğin 0,01'den fazla olmayan bir Tip I hatası ile sonuçlandığını doğrulamıştır.

Tablo 5 Kör Sınırı

Varyant Türü	Toplam Gözlemler	LoB Reaktif Lotu 1 (%)	LoB Reaktif Lotu 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
İnsersiyon	504	0,56	0,56
Delesyon	1008	1,20	1,20

LoD için, 0,026 eşiğinin altına düşen her varyant türünün her reaktif lotu için münferit mutasyon frekansının yüzdesi hesaplanmıştır (Tablo 6). Yüzdeler %5 (0,05) Tip II hatasından daha düşük oldukları için, birleştirilmiş varyant frekanslarının medyanı LoD olarak hesaplanmıştır (Tablo 6). Her varyant türü için LoD olarak, iki reaktif lotu için hesaplanmış iki değerden büyük olanı alınmıştır; SNV'ler için %4,97, insersiyonlar için %5,12 ve delesyonlar için %5,26.

Tablo 6 Saptama Sınırı

Reaktif Lotu	Varyant Türü	Toplam Gözlemler	VAF Ölçümlerinin Sayısı < %2,6	VAF Ölçümlerinin %'si < %2,6	Saptama Sınırı (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	İnsersiyon	420	6	1,4	5,08
	Delesyon	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	İnsersiyon	420	5	1,2	5,12
	Delesyon	840	7	0,80	5,26

Doğruluk

Germ Hattı

Aşağıdaki çalışma, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak, NextSeq 550Dx instrument cihazında Germ Hattı Varyantı Modülü'nün varyant arama doğruluğunu değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. 13 benzersiz Platinum Genome numunesi, 23 farklı kromozom genelinde 12.588 bazı (150 ampikon) kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanan bir temsili test kullanılarak test edilmiştir. Üç sekanslama cihazı, üç reaktif lotu ve üç operatör ile birlikte beş başlangıç gününde toplam dokuz çalıştırma

gerçekleştirilmiştir. SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, sonuçların iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntem olan Platinum Genomes 2016-1.0 versiyonu ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Güvenilir genomik bölgeler, aksi belirtilmedikçe bu referans yöntemine göre tanımlanmıştır.

Tablo 7 Germ Hattı Uyumunun Özeti

Kriterler	Toplam Gözlemler ¹	Gözleme Göre Sonuç ²	Çalıştırmaya göre Sonuç ³
SNV için PPA	819	98,7	>99,9
İnsersiyonlar için PPA	819	95,0	98,9
Delesyonlar için PPA	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Çalıştırma başına numune sayısı (91) x Çalıştırma sayısı (9) = 819 olarak hesaplanmıştır.

²Tüm 9 çalıştırma genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer.

³Her bir çalıştırmadan elde edilen veriler toplu olarak analiz edildiğinde bulunan en düşük değer.

Tablo 8, varyant sonuçlarının PPA hesaplamaları için Platinum Genomes versiyon 2016-1.0 ile 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 8 Numune Başına Germ Hattı Uyumu

Numune	Ortalama Arama Oranı	Beklenen Varyantlar ¹	TP	FN	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9

Numune	Ortalama Arama Oranı	Beklenen Varyantlar ¹	TP	FN	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ 9 çalıştırma genelinde tüm numune kopyalarındaki toplam varyant sayısı.

Tablo 9, varyant sonuçlarının, iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında sunulan çalışma verilerini içermektedir. Saptama, her bir varyant türü için (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ayrı ayrı değerlendirilir. Referans konumlar hariç tutulur.

Tablo 9 Varyant Türüne Göre Numune Başına Germ Hattı Uyumu

Numune	SNV'ler			İnsersiyonlar			Delesyonlar		
	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Numuneler küçük insersiyon ve delesyonları (insersiyon/delesyon) aramak için ilaveten analiz edilmiştir. **Tablo 10** kısmında genel bir özet sunulmaktadır. Boyutları insersiyonlar için 1-24 bp, delesyonlar için 1-25 baz çifti (bp) arasında değişen toplam 71 insersiyon/delesyon vardı.

Tablo 10 Germ Hattı İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti

Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	PPA
İnsersiyon	18522	18018	27	477	99,9
Delesyon	17388	17073	0	315	100

Temsili test, çeşitli genomik içerikleri kapsamak amacıyla tasarlanmış 150 amplikondan oluşmuştur. Amplikonların GC içeriği 0,19–0,87 aralığında olmuştur. Amplikonlar ayrıca bir dizi tek nükleotid (ör. PolyA, PolyT), dinükleotid ve trinükleotid tekrarları içermiştir. Veriler, genomik içeriğin doğru arama yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemek için amplikon bazında derlenmiştir (Tablo 11). Doğru arama yüzdesi, varyant ve referans aramalardan oluşur ve hatalı arama veya 'arama yok' (no call) olması durumunda %100'den azdır.

Tablo 11 Germ Hattı Amplikon Düzeyinde Doğruluk

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
1	1	36450499	36450591	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), insersiyon/delesyon	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	İnsersiyon/Delesyon	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), insersiyon/delesyon	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), insersiyon/delesyon	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	İnsersiyon/Delesyon	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	İnsersiyon/Delesyon	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A (Geçerli Değil)	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), insersiyon/delesyon	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), insersiyon/delesyon	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A (Geçerli Değil)	0,43	67977	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), insersiyon/delesyon	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	İnsersiyon/Delesyon	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A (Geçerli Değil)	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), insersiyon/delesyon	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), insersiyon/delesyon	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A (Geçerli Değil)	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A (Geçerli Değil)	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), insersiyon/delesyon	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	İnsersiyon/Delesyon	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	İnsersiyon/Delesyon	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), insersiyon/delesyon	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	İnsersiyon/Delesyon	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A (Geçerli Değil)	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	İnsersiyon/Delesyon	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	İnsersiyon/Delesyon	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), insersiyon/delesyon	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A (Geçerli Değil)	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A (Geçerli Değil)	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), insersiyon/delesyon	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	İnsersiyon/Delesyon	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	İnsersiyon/Delesyon	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A (Geçerli Değil)	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), insersiyon/delesyon	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	İnsersiyon/Delesyon	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), insersiyon/delesyon	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A (Geçerli Değil)	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A (Geçerli Değil)	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A (Geçerli Değil)	0,45	78624	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
68	11	30177648	30177717	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A (Geçerli Değil)	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	İnsersiyon/Delesyon	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A (Geçerli Değil)	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A (Geçerli Değil)	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	İnsersiyon/Delesyon	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), insersiyon/delesyon	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), insersiyon/delesyon	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A (Geçerli Değil)	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A (Geçerli Değil)	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), insersiyon/delesyon	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	İnsersiyon/Delesyon	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	İnsersiyon/Delesyon	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A (Geçerli Değil)	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	İnsersiyon/Delesyon	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	İnsersiyon/Delesyon	0,62	76986	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	İnseriyon/Delesyon	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	İnseriyon/Delesyon	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A (Geçerli Değil)	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	İnseriyon/Delesyon	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A (Geçerli Değil)	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), insersiyon/delesyon	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	İnseriyon/Delesyon	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	İnseriyon/Delesyon	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), insersiyon/delesyon (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT (4), insersiyon/delesyon	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	İnseriyon/Delesyon	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A (Geçerli Değil)	0,37	74529	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), insersiyon/delesyon	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), insersiyon/delesyon	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), insersiyon/delesyon	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A (Geçerli Değil)	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/A (Geçerli Değil)	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A (Geçerli Değil)	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A (Geçerli Değil)	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N/A (Geçerli Değil)	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	BT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), insersiyon/delesyon	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	İnsersiyon/Delesyon	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	İnsersiyon/Delesyon	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	İnsersiyon/Delesyon	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	İnsersiyon/Delesyon	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), insersiyon/delesyon	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), insersiyon/delesyon	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	İnsersiyon/Delesyon	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A (Geçerli Değil)	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	İnsersiyon/Delesyon	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A (Geçerli Değil)	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	İnsersiyon/Delesyon	0,66	75348	0	0	100

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A (Geçerli Değil)	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A (Geçerli Değil)	0,55	0	0	0	N/A (Geçerli Değil)
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A (Geçerli Değil)	0,48	0	0	0	N/A (Geçerli Değil)
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	N/A (Geçerli Değil)

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 ampikon içerisinden, NIST sekansında 92 ampikon tamamen oldukça güvenli genomik bölgeler içinde olmuştur, 41 ampikon kısmi örtüşme göstermiştir ve 17 ampikon örtüşmemiştir. Bu sonuç, karşılaştırma için kopya başına 10.000 koordinatla sonuçlanmıştır. Varyant olmayan baz aramaları, insan genomu referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk sonuçları [Tablo 12](#) içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 12 NIST Veritabanı ile NA12878 Numunesinin Germ Hattı Uyumu

Numune	Ampikon Sayısı	Ortalama Arama Oranı	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Dokuz çalıştırmadan oluşan bu Germ Hattı çalışmasıyla elde edilen verilere göre NextSeq 550Dx instrument aşağıdakileri tutarlı bir şekilde sekanslayabilir:

- GC içeriği \geq %19 (%19 GC içerikli 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %0,6 olmuştur)
- GC içeriği \leq %87 (%87 GC içerikli 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) durumunun oranı sıfır olmuştur)
- PolyA uzunlukları \leq 9 (dokuz nükleotidin PolyA tekrarını içeren 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) durumunun oranı sıfır olmuştur)
- PolyT uzunlukları \leq 10 (on nükleotidin PolyT tekrarını içeren 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) durumunun oranı sıfır olmuştur)
- PolyG uzunlukları \leq 7 (yedi nükleotidin PolyG tekrarını içeren 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %1,0 olmuştur)
- PolyC uzunlukları \leq 6 (altı nükleotidin PolyC tekrarını içeren 2457 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) durumunun oranı sıfır olmuştur)
- Dinükleotid tekrar uzunlukları \leq 11x (11x dinükleotid tekrarını içeren 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %0,5 olmuştur)
- Trinükleotid tekrar uzunlukları \leq 5x (5x trinükleotid tekrarını içeren 819 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %0,5 olmuştur)
- İnsersiyon uzunlukları \leq 24 (24 nükleotid insersiyonu içeren sekanslanan 819 ampikonda 66.370 aranan bazdan 66.343'ü doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %1,2 olmuştur; 24 nükleotid insersiyonu içeren bölgede hiçbir hatalı arama olmamıştır)
- Delesyon uzunlukları \leq 25 (25 nükleotid delesyonu içeren 2457 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) durumunun oranı sıfır olmuştur)

Somatik

Burada açıklanan çalışma, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak NextSeq 550Dx instrument cihazında Somatik Varyant Modülü'nün varyant arama doğruluğunu değerlendirmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmada, 23 farklı kromozom genelinde 12.588 bazı (150 amplikon) kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılmıştır. Bu çalışmada, değerlendirme için altı benzersiz numune oluşturmak üzere FFPE uygulanmış bloklardan Platinum Genome DNA ekstrakte edilmiştir.

Numune GM12877 DNA'sı yaklaşık %5 ve %7 varyant frekanslarına sahip benzersiz bir heterozigot varyant kümesi olarak GM12877-D5 ve GM12877-D7 oluşturmak üzere numune GM12878 DNA'sı ile seyreltilmiştir. Numune GM12878 DNA'sı benzer bir şekilde numune GM12877 DNA'sı ile seyreltilerek GM12878-D5 ve GM12878-D7 oluşturulmuştur. Seyreltilmiş numuneler haricindeki her numune üç kopya halinde test edilmiştir. Seyreltilmiş numuneler ise altı kopya halinde test edilmiştir. Üç sekanslama cihazı, üç reaktif lotu ve üç operatör ile birlikte beş başlangıç gününde toplam dokuz çalıştırma gerçekleştirilmiştir. SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, sonuçların iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntem olan Platinum Genomes versiyon 2016 - 1.0 ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Güvenilir genomik bölgeler, aksi belirtilmedikçe bu referans yöntemine göre tanımlanmıştır.

Tablo 13 Somatik Uyumu Özeti

Kriterler	Toplam Gözlemler ¹	Gözleme Göre Sonuç ²	Çalıştırmaya göre Sonuç ³
SNV için PPA	378	98,9	99,9
İnsersiyonlar için PPA	378	96,9	99,9
Delesyonlar için PPA	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Çalıştırma başına numune sayısı (42) x Çalıştırma sayısı (9) = 378 olarak hesaplanmıştır.

²Tüm 9 çalıştırma genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer.

³Her bir çalıştırmadan elde edilen veriler toplu olarak analiz edildiğinde bulunan en düşük değer.

Tablo 14, 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 14 Numune Başına Somatik Uyumu

Numune	Ortalama Arama Oranı	Beklenen	TP	FN	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

Tablo 15, varyant sonuçlarının, iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında sunulan çalışma verilerini içermektedir. Saptama, her bir varyant türü için (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ayrı ayrı değerlendirilir. Referans konumlar hariç tutulur.

Tablo 15 Varyant Türüne Göre Numune Başına Somatik Uyumu

Numune	SNV'ler			İnsersiyonlar			Delesyonlar		
	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0

Numune	SNV'ler			İnsersiyonlar			Delesyonlar		
	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

On numune küçük insersiyon ve delesyonları (insersiyon/delesyon) aramak için ilaveten analiz edilmiştir (Tablo 16). Boyutları insersiyonlar için 1-24 bp, delesyonlar için 1-25 baz çifti (bp) arasında değişen toplam 71 insersiyon/delesyon vardı.

Tablo 16 Somatik İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti

Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant 'Arama Yok' (No Call) Durumları	PPA
İnsersiyon	10773	10282	9	482	99,2
Delesyon	11502	10667	5	830	>99,9

150 ampikon çeşitli genomik içerikleri kapsamak amacıyla tasarlanmıştır. Ampikonların GC içeriği %0,19–0,87 aralığında olmuştur. Ampikonlar ayrıca bir dizi tek nükleotid (ör. PolyA, PolyT), dinükleotid ve trinükleotid tekrarları içermiştir. Veriler, genomik içeriğin doğru arama yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemek için ampikon bazında derlenmiştir (Tablo 17). Doğru arama yüzdesi, varyant ve referans aramalardan oluşur ve hatalı arama veya 'arama yok' (no call) olması durumunda %100'den azdır.

Tablo 17 Somatik Ampikon Düzeyinde Doğruluk

Ampikon	Kromozom	Ampikon Başlangıcı	Ampikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Ampikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
1	1	36450499	36450591	93	93	İnseriyon/Delesyon	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), insersiyon/delesyon	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	İnseriyon/Delesyon	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	İnseriyon/Delesyon	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), insersiyon/delesyon	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), insersiyon/delesyon	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	İnseriyon/Delesyon	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	İnseriyon/Delesyon	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A (Geçerli Değil)	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), insersiyon/delesyon	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A (Geçerli Değil)	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), insersiyon/delesyon	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A (Geçerli Değil)	0,43	31339	0	44	99,9

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), insersiyon/delesyon	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	İnsersiyon/Delesyon	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A (Geçerli Değil)	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), insersiyon/delesyon	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), insersiyon/delesyon	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A (Geçerli Değil)	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A (Geçerli Değil)	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), insersiyon/delesyon	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	İnsersiyon/Delesyon	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	İnsersiyon/Delesyon	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), insersiyon/delesyon	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	İnsersiyon/Delesyon	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A (Geçerli Değil)	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	İnseriyon/Delesyon	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	İnseriyon/Delesyon	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), insersiyon/delesyon	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A (Geçerli Değil)	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	İnseriyon/Delesyon	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A (Geçerli Değil)	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), insersiyon/delesyon	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	İnseriyon/Delesyon	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	İnseriyon/Delesyon	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A (Geçerli Değil)	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), insersiyon/delesyon	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	İnseriyon/Delesyon	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), insersiyon/delesyon	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A (Geçerli Değil)	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A (Geçerli Değil)	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A (Geçerli Değil)	0,45	36105	0	192	99,5

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
68	11	30177648	30177717	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A (Geçerli Değil)	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	İnsersiyon/Delesyon	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A (Geçerli Değil)	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A (Geçerli Değil)	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	İnsersiyon/Delesyon	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), insersiyon/delesyon	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), insersiyon/delesyon	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A (Geçerli Değil)	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A (Geçerli Değil)	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), insersiyon/delesyon	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	İnsersiyon/Delesyon	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	İnsersiyon/Delesyon	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A (Geçerli Değil)	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	İnsersiyon/Delesyon	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	İnsersiyon/Delesyon	0,62	35472	0	69	99,8

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	İnsersiyon/Delesyon	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), insersiyon/delesyon	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	İnsersiyon/Delesyon	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A (Geçerli Değil)	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	İnsersiyon/Delesyon	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A (Geçerli Değil)	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), insersiyon/delesyon	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), insersiyon/delesyon	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	İnsersiyon/Delesyon	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	İnsersiyon/Delesyon	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), insersiyon/delesyon (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT (4), insersiyon/delesyon	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	İnsersiyon/Delesyon	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A (Geçerli Değil)	0,37	34386	0	12	>99,9

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), insersiyon/delesyon	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), insersiyon/delesyon	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), insersiyon/delesyon	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A (Geçerli Değil)	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	N/A (Geçerli Değil)	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A (Geçerli Değil)	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A (Geçerli Değil)	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	N/A (Geçerli Değil)	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	BT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), insersiyon/delesyon	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	İnsersiyon/Delesyon	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	İnsersiyon/Delesyon	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	İnsersiyon/Delesyon	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	İnsersiyon/Delesyon	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), insersiyon/delesyon	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), insersiyon/delesyon	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	İnsersiyon/Delesyon	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A (Geçerli Değil)	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	İnsersiyon/Delesyon	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A (Geçerli Değil)	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	İnsersiyon/Delesyon	0,66	34754	0	22	99,9

Amplikon	Kromozom	Amplikon Başlangıcı	Amplikon Sonu	Analiz Edilen Fragman Boyutu	Güvenilir Bölgelerdeki Bazlar	Amplikon Genomik İçeriği	GC içeriği	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	'Arama Yok' (No Call) Durumları	Doğru Arama Yüzdesi
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A (Geçerli Değil)	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A (Geçerli Değil)	0,55	0	0	0	Geçerli Değil
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A (Geçerli Değil)	0,48	0	0	0	Geçerli Değil
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Geçerli Değil

Numune GM12878 için sekanslama sonuçları, National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) tarafından oluşturulan NA12878 için oldukça güvenilir bir genotip ile karşılaştırılmıştır. 150 ampikon içerisinden, NIST sekansında 92 ampikon tamamen oldukça güvenli genomik bölgeler içinde olmuştur, 41 ampikon kısmi örtüşme göstermiştir ve 17 ampikon örtüşmemiştir. Bu sonuç, karşılaştırma için kopya başına 10.000 koordinatla sonuçlanmıştır. Varyant olmayan baz aramaları, insan genomu referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk sonuçları [Tablo 18](#) içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 18 NIST Veritabanı ile GM12878 Numunesinin Somatik Uyumu

Numune	Ampikon Sayısı	Ortalama Arama Oranı	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Dokuz çalıştırmadan oluşan bu Somatik çalışmasıyla elde edilen verilere göre NextSeq 550Dx instrument aşağıdakileri tutarlı bir şekilde sekanslayabilir:

- GC içeriği \geq %19 (%19 GC içeren 378 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %2,6 olmuştur)
- GC içeriği \leq %87 (%87 GC içeren 378 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %0,6 olmuştur)
- PolyA uzunlukları \leq 9 (dokuz nükleotidin PolyA tekrarını içeren 378 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %2,5 olmuştur)
- PolyT uzunlukları \leq 10 (on nükleotidin PolyT tekrarını içeren 378 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %0,1'den az olmuştur)
- PolyG uzunlukları \leq 6 (altı nükleotidin PolyG tekrarını içeren 2268 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %0,5 olmuştur)
- PolyC uzunlukları \leq 6 (altı nükleotidin PolyC tekrarını içeren 756 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %0,4 olmuştur)
- Dinükleotid tekrar uzunlukları \leq 4x (4x dinükleotid tekrarını içeren 1890 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %0,9 olmuştur)
- Trinükleotid tekrar uzunlukları \leq 5x (5x trinükleotid tekrarını içeren 378 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %1,4 olmuştur)
- İnsersiyon uzunlukları \leq 23 (23 nükleotid insersiyonu içeren 378 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, 'arama yok' (no call) oranı %0,8 olmuştur)
- Delesyon uzunlukları \leq 25 (25 nükleotid delesyonu içeren 1134 sekanslanan ampikonda tüm aranan bazlar doğru aranmıştır; 'arama yok' (no call) oranı %0,7 olmuştur)

Kesinlik

NextSeq 550Dx instrument cihazının kesinliği, beş başlangıç günü boyunca dokuz sekanslama çalıştırması oluşturmak üzere üç cihaz, üç reaktif lotu ve üç operatör ile 13 benzersiz Platinum Genome numunesi test edilerek belirlenmiştir. Temsili test, numuneler ve referans yöntemler germ hattı doğruluk çalışmasında açıklananlar ile aynıdır. Kesinliğe katkı sağlayan unsurlar, yanıt değişkeni olarak VAF kullanılarak ve cihaz, reaktif lotu, operatör ve başlangıç günü için bileşen düzeyinde standart sapmalar hesaplanarak yapılan varyans bileşeni analizine göre belirlenmiştir (Tablo 19). Her bir cihaz, operatör veya reaktif lotu bileşenine ilişkin analizde kullanılan toplam gözlemlerin sayısı SNV'ler için 699, insersiyonlar için 176 ve delesyonlar için 235 olmuştur.

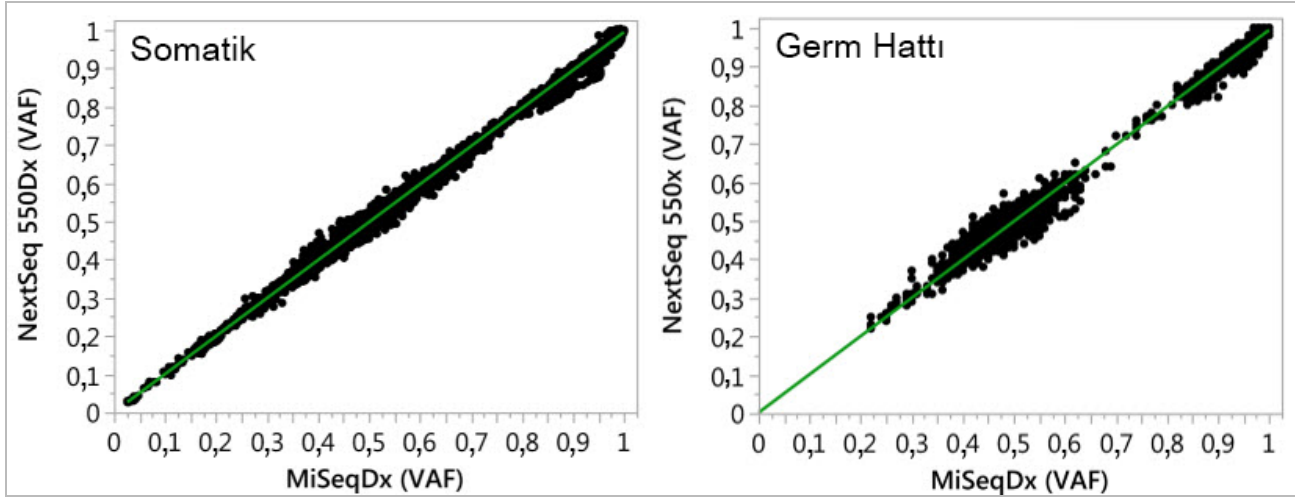
Tablo 19 NextSeq 550Dx Instrument için Kesinlik Sonuçları (Standart Sapma)

Bileşen	Varyant Türü	Bileşen SS Değeri		Toplam SS Değeri	
		Maks	Medyan	Maks	Medyan
Lot	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	İnsersiyon	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delesyon	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Cihaz	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	İnsersiyon	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delesyon	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operatör	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	İnsersiyon	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delesyon	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Gün	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	İnsersiyon	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delesyon	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Yöntem Karşılaştırma (Sekanslama Platformu)

Tam kan ve FFPE numuneleri, NextSeq 550Dx instrument cihazında ve MiSeqDx instrument'ta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx germ hattı ve somatik iş akışları kullanılarak değerlendirilmiştir. Kan ve FFPE numuneleri için varyant frekansı uyumu, birden çok temsili test kullanılarak değerlendirilmiştir. Şekil 2 ile bir temsili test için iki cihaz arasındaki VAF bağıntısına ilişkin grafik sunulmakta ve Tablo 20 ile bu bağıntı, test paneline göre özetlenmektedir. MiSeqDx instrument ile NextSeq 550Dx instrument cihazı arasındaki güçlü bağıntıya göre, pre-analitik faktörler (ör. ekstraksiyon yöntemleri veya enterferan maddeler) ile ilgili performans özelliklerinin her iki cihaz için geçerli olduğu belirlenmiştir. Ek ayrıntılar için TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanım talimatına bakın.

Şekil 2 Test 1 ile FFPE (Sol) ve Kan (Sağ) Numuneleri için MiSeqDx Instrument'ın NextSeq 550Dx Instrument'lara VAF Bağlılığı



Tablo 20 Benzersiz Kan ve FFPE Numuneleri Kullanılarak Gerçekleştirilen Yöntem Karşılaştırma Sonuçları

gDNA Kaynağı	Test (Oligo Paneli)	Biyolojik Kopyalar (Numuneler)	Teknik Kopyalar (Numune başına)	Gözlemler (Varyant Sayısı)	Eğim	Kesişme	Bağlılık (R ²)
Kan	Test 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Kan	Test 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Test 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Test 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Germ Hattı Varyantı Modülü için belirtilen sınırlamaya dayalı olarak iki veri noktası çıkarılmıştır.

²Şekil 2'de gösterildiği şekilde VAF grafiklerine ilişkin belirleme katsayısı.

Tekrarlanabilirlik

NextSeq 550Dx instrument cihazının tekrarlanabilirliği; 150 amplicon kullanarak 23 farklı kromozomda 12.588 bazı kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test ile Platinum Genome numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Germ hattı testi 13 numunenin yedi kopyasını içermiştir; somatik testi ise farklı VAF düzeylerinde yedi numunenin altı kopyasını içermiştir. Numuneler TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanılarak hazırlanmıştır.

Test, bir NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) lotu kullanılarak üç harici tesiste gerçekleştirilmiştir. Her tesiste tek bir NextSeq 550Dx instrument kullanılmıştır. Her tesiste testi iki operatör gerçekleştirmiştir. Her operatör, üç tesis genelinde toplam 36 çalıştırma olmak üzere, her bir numune türü için ardışık olmayan üç başlangıç gününde testi gerçekleştirmiştir. Bu test sonucunda germ hattı ve somatik iş akışlarının her biri için 18 çalıştırma elde edilmiştir.

Germ Hattı

VAF düzeyi $\geq 0,2$ olan germ hattı varyantları pozitif (varyant) olarak raporlanır. Beklenen pozitif germ hattı varyantları için veriler, her bir varyant türündeki (SNV, insersiyon, delesyon) 'arama yok' (no call) oranı ve doğru pozitif arama oranı açısından değerlendirilmiştir. [Tablo 21](#) kısmında, her bir varyant türü için Wilson Skoru yöntemiyle hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranlar özetlenmektedir.

Tablo 21 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Germ Hattı Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Arama Yok (No Call)			Doğru Pozitif Arama				
	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	%95 LCL	%95 UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
İnsersiyonlar	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Delesyonlar	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

VAF düzeyi $< 0,2$ olan germ hattı varyantları negatif (yabani tip) olarak raporlanır. Beklenen negatif germ hattı konumları için, veriler 'arama yok' (no call) ve doğru yabani tip arama oranları açısından değerlendirilmiştir. [Tablo 22](#) kısmında, Wilson Skoru yöntemiyle hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranlar özetlenmektedir.

Tablo 22 Beklenen Negatif Sonuçlar için Germ Hattı Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Arama Yok (No Call)			Doğru Negatif Arama				
	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	%95 LCL	%95 UCL
Yabani tip	4883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

VAF düzeyi $\geq 0,2$ ve $< 0,7$ olan germ hattı varyantlarının arama sonucu, varyant için pozitif heterozigot ve VAF düzeyi $\geq 0,7$ olan varyantların arama sonucu, varyant için pozitif homozigot şeklindedir. Testin doğal değişkenliğinin genotip aramasını etkileyip etkilemeyeceğini belirlemek için heterozigot varyantlar içeren numuneler kullanılmıştır. Cx her iki eşik için (heterozigot genotipler için 0,2 ve homozigot genotipler için 0,7) belirlenmiştir; burada x, eşiği aşan tekrarlanan testlerin oranıdır. 0,2 VAF alt eşiği için, Cx $\geq \%99,999$ olmuştur; buna göre, heterozigot varyantların $\geq \%99,999$ 'unun arama sonucu heterozigot olur. 0,7 VAF üst eşiği için, Cx $\leq \%0,001$ olmuştur; buna göre, heterozigot varyantların $\leq \%0,001$ 'inin arama sonucu homozigot olur. [Tablo 23](#) ile varyant türüne göre sonuçların özeti sunulmaktadır.

VAF düzeyi $\geq 0,2$ ve $< 0,7$ olan germ hattı varyantlarının arama sonucu, varyant için pozitif heterozigot ve VAF düzeyi $\geq 0,7$ olan varyantların arama sonucu, varyant için pozitif homozigot şeklindedir. Testin doğal değişkenliğinin genotip aramasını etkileyip etkilemeyeceğini belirlemek için heterozigot varyantlar içeren numuneler kullanılmıştır. Cx her iki eşik için (heterozigot genotipler için 0,2 ve homozigot genotipler için 0,7) belirlenmiştir; burada x, eşiği aşan tekrarlanan testlerin oranıdır. 0,2 VAF alt eşiği bakımından, Cx $\geq \%99,999$

olmuştur; buna göre, heterozigot varyantların \geq %99,999'unun arama sonucu heterozigot olur. 0,7 VAF üst eşiği için, $Cx \leq$ %0,001 olmuştur; buna göre, heterozigot varyantların \leq %0,001'inin arama sonucu homozigot olur.

[Tablo 23](#) ile varyant türüne göre sonuçların özeti sunulmaktadır.

Tablo 23 Heterozigot Varyantlar için Germ Hattı Cx Değerleri

Varyant Türü	0,2 VAF'de Eşik	0,7 VAF'de Eşik
	$\geq C$ %99,999	$\leq C$ %0,001
SNV	94/94	94/94
İnsersiyonlar	24/24	24/24
Delesyonlar	35/35	35/35
Toplam	153	153

Somatik

VAF düzeyi \geq 0,026 olan somatik varyantları pozitif (varyant) olarak raporlanır. VAF düzeyleri \geq 0,01 ve $<$ 0,026 VAF olan gözlemler, bu analizin amaçları doğrultusunda belirsiz olarak değerlendirilmiştir (ne pozitif ne negatif; düşük varyant frekansı olarak işaretlenir). Performansı değerlendirmek için, sonuçlar üç şekilde hesaplanmıştır:

- En iyi durum: Tüm belirsiz sonuçlar, doğru pozitif arama olarak değerlendirilmiştir (beklenen sonuçlarla uyumlu)
- En kötü durum: Tüm belirsiz sonuçlar, hatalı arama olarak değerlendirilmiştir (beklenen sonuçlarla uyumsuz)
- Hariç bırakma durumu: Tüm belirsiz sonuçlar analizden hariç tutulmuştur

[Tablo 24](#), [Tablo 25](#) ve [Tablo 26](#) olmak üzere verilen üç tabloda sırasıyla en iyi durum, en kötü durum ve hariç tutma durumu ile ilişkili arama sonuçları ve Wilson Skoru yöntemi kullanılarak hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) özetlenmektedir.

Tablo 24 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Somatik Arama Gözlemleri (En İyi Durum)

Varyant türü	Doğru Pozitif Arama				
	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	%95 LCL	%95 UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
İnsersiyonlar	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Delesyonlar	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tablo 25 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Somatik Arama Gözlemleri (En Kötü Durum)

Varyant Türü	Doğru Pozitif Arama				
	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	%95 LCL	%95 UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
İnsersiyonlar	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Delesyonlar	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tablo 26 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Somatik Arama Gözlemleri (Belirsiz Aramalar Çıkarılmış)

Varyant Türü	Doğru Pozitif Arama				
	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	%95 LCL	%95 UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
İnsersiyonlar	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Delesyonlar	18.381	18.381	100	99,98	100,00

VAF düzeyi $< 0,01$ olan somatik varyantları negatif (yabani tip) aramalar olarak raporlanır. Beklenen negatif somatik konumları için, veriler 'arama yok' (no call) oranı ve doğru yabani tip arama oranı açısından değerlendirilmiştir. Doğru yabani tip aramalar, 'arama yok' (no call) durumlarının hariç tutulması ve belirsiz bölgeye (VAF düzeyleri $\geq 0,01$ ve $< 0,026$) denk gelen gözlemlenen aramaların ve eşinin (VAF düzeyleri $\geq 0,026$) üzerinde olan hatalı aramaların toplamdan çıkarılmasıyla belirlenmiştir. [Tablo 27](#) kısmında, 'arama yok' (no call) oranı ve doğru yabani tip arama oranı bakımından negatif somatik konumları için gözlemlenen, toplam ve yüzde sonuçları ile Wilson Skoru yöntemi kullanılarak hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) özetlenmektedir.

Tablo 27 Beklenen Negatif Sonuçlar için Somatik Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Arama Yok (No Call)					Doğru Arama				
	Gözlemlenen	Toplam	Yüzde	Belirsiz	Hatalı	Doğru	Toplam	Yüzde	%95 LCL	%95 UCL
Yabani tip	36.326	8.909.676	0,408	2254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Testin C95 değerini (her bir varyant türünde) belirlemek için aynı varyant için farklı VAF düzeylerinde somatik numuneleri değerlendirilmiştir. Test eşiği yakınında değişkenliği değerlendirmek için, beklenen VAF düzeyleri 0,02 ile 0,07 arasında olan numuneler kullanılmıştır. Her bir varyant için C95 değeri belirlenmiş, her varyant türüne ilişkin en yüksek C95 değeri [Tablo 28](#) kısmında raporlanmıştır.

Tablo 28 Somatik C95 Özeti

Varyant Türü	N	C95
SNV	74	0,0613

İnsersiyon	24	0,0573
Delesyon	33	0,0575

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) Performansı

Genel Bakış

NextSeq 550Dx iki reaktif kiti ile desteklenir: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü). NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) ürününün NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ile doğrulanmış ve valide edilmiş analitik performans gerekliliklerini karşılayabildiğini göstermek üzere NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) ile çalışmalar yapılmıştır. Biri Germ hattı iş akışı ve biri Somatik iş akışı ile olmak üzere TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanılarak iki kütüphane hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir iş akışına ilişkin kütüphaneler üç NextSeq 550Dx instrument kullanılarak üç NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) lotu ile test edilmiştir. Ek olarak, her bir iş akışına ilişkin testler kapsamında NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ile tek çalıştırma yapılmıştır.

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

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ile yapılan doğrulama, NextSeq 550Dx instrument cihazının Tip II hata $\leq 0,05$ ile $0,05$ VAF'de varyantları saptayabildiğini ve Somatik Varyant Modülü'nde (geçerli LoB) kullanılan $0,026$ VAF eşiğinin Tip I hata $\leq 0,01$ değerini desteklediğini göstermiştir. Bu iddialara göre, $0,05$ VAF'deki varyantın %95 oranla $0,026$ VAF'den yüksek veya buna eşit olması ve yabancı tip konumunun %99 oranla $0,026$ VAF'den düşük olması beklenmektedir. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) ile bu iddiaların sağlandığından emin olmak için NextSeq 550Dx instrument'ta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kullanılarak yabancı tip numuneler (LoB numuneleri) ile ve $0,05$ VAF'de varyantlar içeren numuneler (LoD numuneleri) ile tekrar ölçümleri gerçekleştirilmiştir. $0,026$ eşiğinin üzerindeki ve altındaki aramaların oranı daha sonra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ile belirlenen iddialarla karşılaştırılmıştır.

Test kapsamında, her biri $0,05$ VAF'ye hedeflenen benzersiz bir varyant seti içeren iki LoD numunesi ve hedeflenen varyantlar için yabancı tip olan karşılık gelen LoB numuneleri ele alınmıştır. Kütüphane hazırlama için TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kullanılarak sırasıyla sekiz ve yedi kopya halinde LoD ve LoB numuneleri işlenmiştir. Kütüphaneler, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) ile LoB/LoD değerlendirmeye ilişkin varyantları/genom koordinatlarını tanımlamak için başlangıçta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak sekanslanmıştır. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) sonuçlarına göre ortalama VAF değeri $0,045 - 0,055$ (LoD Varyantları) olan tüm varyantlar LoD analizi için kullanılmıştır (N = 51 varyant). LoB analizi için, karşılık gelen 51 genom koordinatı değerlendirilmiştir.

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) değerlendirmesi için kütüphaneler aynı cihaz ve reaktif kiti lotu kullanılarak ardışık üç gün boyunca üç çalıştırmada sekanslanmıştır. Bu testte, 51 LoD varyantının her biri için 24 kopya ve karşılık gelen yabancı tip konumların her biri için 21 kopya elde edilmiştir. VAF < 0,026 olan yabancı tip aramaların oranı [Tablo 29](#) kısmında belirtilmektedir. VAF değeri 0,026'dan yüksek veya buna eşit olan LoD varyant aramaların oranı [Tablo 30](#) ile belirtilmektedir.

Tablo 29 Yabancı Tip Konumları için < 0,026 Olan Aramaların Oranı (LoB İddiasının Değerlendirmesi)

Varyant Türü	Değerlendirilen Konumlar	Toplam Gözlemler	VAF Ölçümlerinin Sayısı $\geq \%2,6$	Oran < $\%2,6$	%95 Güven Aralığının Oranı
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
İnsersiyon	11	231	0	1	0,984 – 1
Delesyon	8	168	0	1	0,978 – 1

Tablo 30 LoD Varyantları için $\geq 0,026$ VAF Aramaların Oranı (LoD İddiası Değerlendirmesi)

Varyant Türü	Değerlendirilen Konumlar	Toplam Gözlemler	VAF Ölçümlerini n Sayısı < $\%2,6$	VAF Ölçümlerini n Sayısı $\geq \%2,6$	Oran $\geq \%2,6$	%95 Güven Aralığının Oranı
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
İnsersiyon	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Delesyon	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Doğruluk

Germ Hattı

Aşağıdaki çalışma, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kullanarak Germ Hattı Varyantı Modülü ile varyant arama doğruluğunu değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Temsili bir test kullanılarak on iki benzersiz Platinum Genome numunesi test edilmiştir. Üç NextSeq 550Dx instrument ve üç NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kullanılarak toplam 11 çalıştırma gerçekleştirilmiştir.

SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, sonuçların iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntem olan Platinum Genomes 2016-1.0 versiyonu ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak gerçekleştirilen tek sekanslama çalıştırmadan elde edilen doğruluk sonuçları referans olarak sağlanmıştır. Sonuçların bir özeti [Tablo 31](#) kısmında sunulmaktadır.

Tablo 31 Germ Hattı Uyumunun Özeti

Kriterler	Toplam Gözlemler (v2.5) ¹	Gözleme Göre Sonuç (v2.5) ²	Gözleme Göre Sonuç (v2) ³	Çalıştırmaya Göre Sonuç (v2.5) ⁴	Çalıştırmaya Göre Sonuç (v2) ⁴
SNV için PPA	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
İnsersiyonlar için PPA	1056	100	100	100	100
Delesyonlar için PPA	1056	95,2	95,2	>99,9	>99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Çalıştırma başına numune sayısı x çalıştırma sayısı (çalıştırma başına 96 numune x 11 çalıştırma = 1056 gözlem) olarak hesaplanır.

²Tüm çalıştırmalar genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer (NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 için 11 çalıştırmaya dayalıdır).

³1 çalıştırma genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer (toplam 96 gözlem).

⁴ Her bir çalıştırmadan elde edilen veriler toplu olarak analiz edildiğinde bulunan en düşük değer.

Somatik

Aşağıdaki çalışma, NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kullanılarak NextSeq 550Dx instrument'ta Somatic Variant Module'ün varyant arama doğruluğunu değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. On adet Platinum Genome FFPE numunesi (iki tanesi 0,05 VAF olacak şekilde seyreltilmiş varyantlar içermiştir), temsili bir test kullanılarak test edilmiştir. Üç NextSeq 550Dx instrument ve üç NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) lotu kullanılarak toplam 11 çalıştırma gerçekleştirilmiştir.

SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, sonuçların iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntem olan Platinum Genomes 2016-1.0 versiyonu ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak gerçekleştirilen tek sekanslama çalıştırmasından elde edilen doğruluk sonuçları referans olarak sağlanmıştır. Sonuçların bir özeti [Tablo 32](#) kısmında sunulmaktadır.

Tablo 32 Somatik Uyumu Özeti

Kriterler	Toplam Gözlemler (v2.5) ¹	Gözleme Göre Sonuç (v2.5) ²	Gözleme Göre Sonuç (v2) ³	Çalıştırmaya göre Sonuç (v2.5) ⁴	Çalıştırmaya göre Sonuç (v2) ⁴
SNV için PPA	528	100	100	100	100
İnsersiyonlar için PPA	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
Delesyonlar için PPA	528	100	100	100	100

NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Çalıştırma başına numune sayısı x çalıştırma sayısı (çalıştırma başına 48 numune x 11 çalıştırma = 528 gözlem) olarak hesaplanır.

²Tüm çalıştırmalar genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer (NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 için 11 çalıştırmaya dayalıdır).

³1 çalıştırma genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer (toplam 96 gözlem).

⁴Her bir çalıştırmadan elde edilen veriler toplu olarak analiz edildiğinde bulunan en düşük değer.

Kesinlik

Germ Hattı

Germ Hattı Varyantı Modülü ile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kesinliği, Platinum Genome numuneleri ve bir temsili test kullanılarak değerlendirilmiştir. Test, TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ile tek kütüphane hazırlamadan oluşmuş ve her biri sekiz kopya ile işlenen 12 numune içermiştir. Kütüphaneler üç NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) lotu ve üç NextSeq 550Dx instrument ile toplam dokuz sekanslama çalıştırmasında sekanslanmıştır.

Testin doğal değişkenliğinin genotip aramasını etkileyip etkilemeyeceğini belirlemek için heterozigot varyantlar içeren numuneler kullanılmıştır (N = 153 benzersiz heterozigot varyant). Cx her iki Germ Hattı Varyantı Modülü eşiği için (heterozigot genotip için 0,2 ve homozigot genotipler için 0,7) belirlenmiştir; burada x, eşiği aşan tekrarlanan testlerin oranıdır. 0,2 VAF alt eşiği için, NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 döngü) minimum Cx değerli varyant > %99,9 olmuştur; buna göre, heterozigot varyantların > %99,9'unun arama sonucu heterozigot olur. 0,7 VAF üst eşiği için, NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 döngü) maksimum Cx değerli varyant < %1,5 olmuştur; buna göre, heterozigot varyantların ≤ %1,5'inin arama sonucu homozigot olur. [Tablo 33](#) ile varyant türüne göre sonuçların özeti sunulmaktadır. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak gerçekleştirilen tek sekanslama çalıştırmasından elde edilen Cx değerleri referans olarak sağlanmıştır.

Tablo 33 Heterozigot Varyantlar için Germ Hattı Cx Değerleri

Varyant Türü	N	0,2 VAF'de Eşik		0,7 VAF'de Eşik	
		Min Cx (v2.5) ¹	Min Cx (v2) ²	Max Cx (v2.5) ¹	Max Cx (v2) ²
SNV	94	>%99,9	>%99,9	%1,5	%1,0
İnsersiyonlar	24	%100	%100	%0	<%0,1
Delesyonlar	35	%100	>%99,9	<%0,1	<%0,1

¹Cx değerleri, varyans bileşen analizinden elde edilen Toplam Standart Sapmaya dayalıdır.

²Cx değerleri Numune Standart Sapmalarına dayalıdır.

Somatik

Somatic Variant Module ile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) kesinliği, Platinum Genome FFPE numuneleri ve bir temsili test kullanılarak değerlendirilmiştir. Test, TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ile tek kütüphane hazırlamadan oluşmuş ve her biri sekiz kopya ile işlenen iki numune içermiştir. Kütüphaneler üç NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) lotu ve üç NextSeq 550Dx instrument kullanılarak toplam dokuz sekanslama çalıştırmasında sekanslanmıştır.

Beklenen VAF düzeyleri $\leq 0,10$ VAF (N = 131 benzersiz varyant) olan somatik varyantlar, Somatic Variant Module VAF eşiğine yakın cihaz değişkenliğini değerlendirmek için kullanılmıştır (VAF düzeyi $\geq 0,026$ içeren somatik varyantların arama sonucu varyant için pozitif olur). C95 değerleri, somatik varyantların her biri için belirlenmiştir. C95 değerleri, Somatic Variant Module VAF eşliğinden yüksek olma olasılığının %95 olduğu VAF'yi temsil eder. Varyant türüne göre C95 değerleri [Tablo 34](#) kısmında raporlanmıştır. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak gerçekleştirilen tek sekanslama çalıştırmasından elde edilen C95 sonuçları referans olarak sağlanmıştır.

Tablo 34 Somatik C95 Özeti

Varyant Türü	Değerlendirilen Varyantların Sayısı	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
İnsersiyonlar	24	0,062	0,061
Delesyonlar	33	0,060	0,060

¹C95 değerleri, varyans bileşen analizinden elde edilen Toplam Standart Sapmaya dayalıdır.

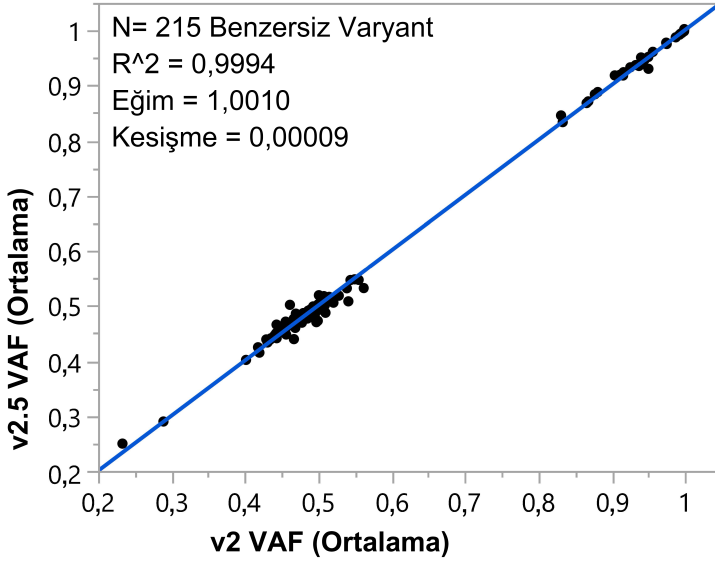
²C95 değerleri Numune Standart Sapmalarına dayalıdır.

Yöntem Karşılaştırma (Reaktif Kiti)

Germ Hattı

215 benzersiz varyanttan elde edilen ortalama VAF değerleri, Germ Hattı Varyantı Modülü'nde oluşturulan sonuçlar kullanılarak NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) genelinde değerlendirilmiştir. VAF ortalamaları, 11 sekanslama çalıştırmasından (v2.5) ve bir sekanslama çalıştırmasından (v2) hesaplanmıştır. Her bir varyant için ortalama hesaplamak üzere en az sekiz kopya kullanılmıştır. [Şekil 3](#) ile iki reaktif kiti arasındaki VAF bağıntısı grafik halinde gösterilmiştir. Reaktif kitleri arasındaki güçlü doğrusal VAF bağıntısı ve sonuçlardaki benzerliklere göre, başlangıçta Germ Hattı Varyantı Modülü ile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak doğrulan ve valide edilen performans özelliklerinin NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) için geçerli olduğu belirlenmiştir.

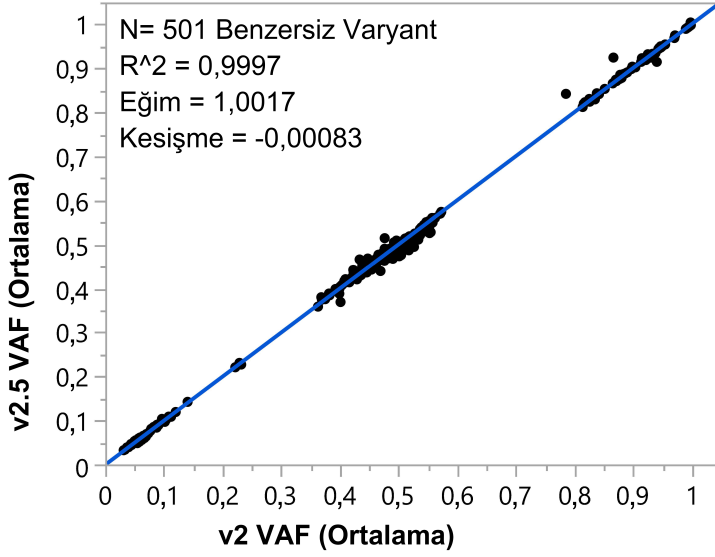
Şekil 3 NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) arasındaki Germ Hattı Varyantı Modülü Varyant Alel Frekansı (VAF) bağıntısı.



Somatik

501 benzersiz varyanta ilişkin ortalama VAF değerleri, Somatic Variant Module'den oluşturulan sonuçlar kullanılarak NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) genelinde değerlendirilmiştir. VAF ortalamaları, 11 sekanslama çalıştırmasından (v2.5) ve bir sekanslama çalıştırmasından (v2) hesaplanmıştır. Her benzersiz varyant için ortalama VAF hesaplamak üzere en az üç kopya kullanılmıştır. Şekil 4 ile iki reaktif kiti arasındaki VAF bağıntısı grafik halinde gösterilmiştir. Reaktif kitleri arasındaki VAF bağıntısı ve sonuçlardaki benzerliklere göre, Somatic Variant Module ile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) kullanılarak doğrulanmış ve valide edilen performans özelliklerinin NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) için geçerli olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4 NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) ve NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü) arasındaki Somatik Varyant Modülü Alel Frekansları (VAF) bağıntısı.



Revizyon Geçmişi

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 1000000030326 v07	Ağustos 2023	illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx'i desteklemek üzere içerik eklendi. Hava Filtresi parça numarası güncellendi. Varyant alel frekanslarını belirlemek için kullanılan FFPE (Somatik) varyant numarası güncellendi. Germ Hattı Uyumunun Özeti güncellendi. Siber güvenlik tehditleri uyarısı eklendi.
Belge No 1000000030326 v06	Mayıs 2022	Kaynak yazılımdan yanlışlıkla eklenen içeriği düzeltmek için güncellemeler yapıldı.
Belge No 1000000030326 v05	Kasım 2021	Ciddi olayların raporlanması bölümüne Uyarılar ve Tedbirler ifadesi eklendi. Prosedür İlkeleri kısmına amaçlanan kullanıcıyı belirten ifade eklendi. High Output Reagent Kit v2 (300 döngü) referansı çıkarıldı. High Output Reagent Kit v2.5 (75 döngü) referansı eklendi.

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 1000000030326 v04	Ağustos 2021	Revizyon Geçmişi tablosu eklendi. AB Yetkili Temsilcisinin adresi güncellendi.

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



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.