

TruSight cisztás fibrózis terméktájékoztató

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA

Cikkszám: 20036925; 1-4 futtatás, készletenként legfeljebb 96 minta

A termék áttekintése

A TruSight™ Cystic Fibrosis Library Prep (cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek) két vizsgálat, a TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat) és a TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat) elvégzéséhez használhatók.

A TruSight cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat rendeltetése

A TruSight cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat (korábbi neve: Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat) kvalitatív *in vitro* diagnosztikai rendszer, amely a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia szabályozó gén (CFTR) 139 klinikailag releváns, cisztás fibrózis betegséget okozó mutációjának és variánsának egyidejű kimutatására szolgál emberi perifériás teljes vérből izolált genomikus DNS-ben. A kimutatott variánsok tartalmazzák az American College of Medical Genetics (ACMG) 2004. évi ajánlásában¹ és az American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2011. évi ajánlásában² szereplő variánsokat. A vizsgálat rendeltetési: reprodukív korú felnőttek körében végzett hordozósűrítés, megerősítő diagnosztikai vizsgálat újszülötteknél és gyermekeknél, valamint első vizsgálat gyaníthatóan cisztás fibrózisban szenvedő személyek diagnosztizálásához. A vizsgálat eredményeit szakvizsgálóval rendelkező klinikai molekuláris genetikusnak vagy ezzel egyenértékű képesítésű szakembernek kell értelmeznie a többi elérhető laboratóriumi és klinikai információval együtt.

Ez a vizsgálat nem javallott újszülöttkori szűrésre, magzati diagnosztikai vizsgálatra, preimplantációs vizsgálatra, illetve önmagában végzett diagnosztikai vizsgálatként való alkalmazásra.

A vizsgálat az Illumina MiSeqDx készüléken való elvégzésre szolgál.

A TruSight cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat rendeltetése

A TruSight cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat (korábbi neve: Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat) célzott szekvenálási *in vitro* diagnosztikai rendszer, amely a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia szabályozó gén (CFTR) fehérjét kódoló és az intron-exon határokon elhelyezkedő területeinek szekvenálására szolgál a K₂EDTA alvadásátlóval levett emberi perifériás teljes vérből izolált genomikus DNS-ben. A vizsgálat kimutatja a szekvenált területén elhelyezkedő egynukleotid-variánsokat és kis méretű indeleket, valamint két, mélyen az intronban elhelyezkedő mutációt és két nagy méretű deléciót. A vizsgálat az Illumina MiSeqDx készüléken való elvégzésre szolgál.

Ez a vizsgálat segítségként szolgál a betegség diagnosztizálásához cisztás fibrózis (CF) gyanúja esetén. E vizsgálatot leginkább olyankor érdemes elvégezni, ha a betegnél a CF atípusosan vagy nem a klasszikus módon jelentkezik, vagy ha más mutációs panelekkel nem sikerült azonosítani a betegséget okozó mindkét mutációt. A vizsgálat eredményeit szakvizsgálóval rendelkező klinikai molekuláris genetikusnak vagy ezzel egyenértékű képesítésű szakembernek kell értelmeznie a klinikai tünetekkel, más diagnosztikai vizsgálatok eredményével és a családi anamnézissel együtt.

Ez a vizsgálat nem szolgál önmagában diagnosztikai célra, magzati diagnosztikai vizsgálatra, preimplantációs vizsgálatra, hordozók szűrésére, újszülöttkori szűrésre vagy lakosság szintű szűrésre.

Cisztás fibrózis – háttér-információk

Klinikai ismertetés

A cisztás fibrózis (CF) a nyugati világ egyik leggyakoribb genetikai rendellenessége és a leggyakoribb életveszélyes autoszomális recesszív rendellenesség a nem latin-amerikai fehér bőrű népességben.^{3–7} A CF növeli a nyálkaváladék viszkózitását, és a légutak, a hasnyálmirigy, a bélrendszer, a máj- és epeutak, a férfi nemi szervek és a verejtékmirigyek hámsejtjeit érinti, több szerv és szervrendszer összetett megbetegedését eredményezve.^{4–6} Elsődlegesen tüdőt érintő szövődmények felelősek a morbiditásért és a halálozásért.⁸ Sok esetben a tápláltsági állapot romlása előrevetíti a CF által okozott tüdőbetegség progresszióját. A jelenlegi beavatkozási erőfeszítések középpontjában az újszülöttkori szűrés segítségével elérhető korai diagnózis áll.⁷ Ez a betegségben szenvedők számára lehetővé teszi, hogy időben hozzájuthassanak a lényeges egészségügyi szolgáltatásokhoz, ami lehetővé teszi a legjobb kimenetel elérését.^{4,7} A túlélésben mutatkoznak nemi különbségek, és a jelentések szerint a férfiak medián túlélése hosszabb; a teljes medián túlélés 38,3 év az USA-ban.⁸

A CFTR-variánsok incidenciája

Az 1989-ben azonosított cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia szabályozó gén (CFTR) a 7-es kromoszóma hosszú karján található, és egy 230 kb hosszúságú szakaszon eloszló 27 kódoló exont tartalmaz.⁴ A normál allérről másolt 6,5 kb hosszúságú mRNS kódolja a CFTR-t, egy 1490 aminosavból álló integrális membránfehérjét, amely szabályozott kloridcsatomaként működik több szerv epitelsejtjeiben.^{4,5} Eddig a CFTR több mint 1900 variánsát írták le, amelyek többsége pontmutáció.⁹ A leggyakoribb CFTR-variáns az F508del allél,⁵ amely az összes CFTR-variáns közel 70%-át teszi ki.³ Azonban más gyakori CFTR-variánsok gyakran eredményeznek CF-fenotípust és más CFTR-hez kapcsolódó rendellenességeket.^{3–5}

A betegség becsült incidenciája 2000–4000 élveszületésből egy, prevalenciája pedig az Egyesült Államokban körülbelül 30 000 személy.⁴ A CF különböző etnikai populációkban különböző gyakorisággal fordul elő: 1/3000 kaukázusi; 1/9200 latin-amerikai; 1/10 900 amerikai őslakos; 1/15 000 afroamerikai; 1/31 000 ázsiai származású amerikai.^{4,6} Az [1. táblázat](#) tartalmazza a CFTR-mutáció hordozási gyakoriságának aktuális becsült értékeit etnikai hovatartozás szerint az Egyesült Államokban, 364 890 olyan személy adatai alapján, akiket hordozói vizsgálatra utaltak, és családi anamnéziséjükben nem szerepelt CF.

1. táblázat: A cisztás fibrózis mutációja hordozásának gyakorisága az Egyesült Államokban élő különböző etnikai csoportokban¹⁰

Etnikai csoport	Hordozás megfigyelt gyakorisága
Afroamerikai	1:84
Askenázi zsidó	1:29
Ázsiai	1:242
Kaukázusi	1:28
Latin-amerikai	1:59
Zsidó	1:32
Közel-keleti	1:91
Amerikai őslakos	1:70
Dél-ázsiai	1:118
Egyéb etnikai hovatartozás	1:111
Egyéb etnikai hovatartozás: egynél több etnikai csoportba tartozó	1:34
Egyéb etnikai hovatartozás: részben afroamerikai	1:56
Egyéb etnikai hovatartozás: részben kaukázusi	1:32
Egyéb etnikai hovatartozás: részben latin-amerikai	1:51
Nincs megadva	1:37
Minden személy összesítve	1:38

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat összefoglalása és magyarázata

A CFTR2 projekt áttekintése

A CFTR2 projekt egy nemzetközi kezdeményezés, amelyet kutatók és klinikusok egy csoportja vezet, és amelyet a National Institute of Health és a U.S. Cystic Fibrosis Foundation támogat.^{11,12} A CFTR2 célja, hogy átfogó és szakértők által felülvizsgált funkcionális és klinikai információkat nyújtson a CFTR-variánsokról. A legalább 0,01%-os allélfrekvenciájú CF-variánsok klinikai validálására törekedve világszerte 25 CF-nyilvántartás és számos klinikai intézmény¹³ egyesítette erőforrásait azzal a céllal, hogy több mint 39 000 CF-beteg klinikai adatait összevessék azzal a közel 1900 CF-variánssal, amelyeket az évek során a CFTR1 adatbázisban rögzítettek (Toronto Hospital for Sick Children).^{11,13} A CFTR genotípusán kívül rögzítették a klinikai jellemzőket, például a verejték kloridkoncentrációját, a tüdőfunkciót (FEV1 a várható százalékában) és a hasnyálmirigy állapotát. A variánsok klinikai, funkcionális és genetikai szempontú egyidejű elemzésének szisztematikus megközelítése 134 egyedi, CF-et okozó variánst eredményezett 129 egyedi genomikus pozícióban (mivel öt pozíció esetében két nukleotidváltozás is megjelenik ugyanabban a pozícióban), amelyek a CFTR2 adatbázisban szerepelnek (2013 augusztusában). Az e variánsok mindegyikét tartalmazó panel használata várhatóan a cisztás fibrózist okozó allélok 95,4%-át fedi le, és mindkét allél kimutatásával ~91%-ra növeli a veszélyeztetett párok azonosításának valószínűségét az ACMG által ajánlott 23 variánsból álló panelre jellemző 72%-ról.

A panelben található CFTR-variánsok

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat által jelentett variánsokat azért választották ki, mert ezek képezik a Johns Hopkins Egyetem CFTR2 adatbázisában (a CFTR2, a Clinical and Functional Translation of CFTR projekt eredménye) szereplő, klinikailag validált, CF-et okozónak minősített variánsok teljes körét.

A vizsgálat a következőket vizsgálja: 134 cisztás fibrózist okozó variáns; egy, az ACMG által ajánlott panelvariáns (R117H, amelyet a CFTR2 változó klinikai következményekkel járó mutációnak (MVCC) minősít); egy feltételesen bejelentett módosító variáns (PolyTG/PolyT); illetve három feltételesen bejelentett jóindulatú variáns (I506V, I507V, F508C)¹⁴; összesen 139 közölt variáns.

A 134 cisztás fibrózist (CF) okozó variáns megfelel a CFTR2 adatbázisban szereplő 129 CF-et okozó variánsnak. A CFTR2 adatbázis öt CF-et okozó variánst tartalmaz, amelyek esetében ugyanaz a fehérjeszint-változás alakulhat ki két különböző nukleotidváltozás [pl. S466X(C>A) és S466X(C>G)] miatt. Ez az öt variáns a CFTR2 adatbázisban az aminosavkód szerint van felsorolva (pl. S466X), míg a vizsgálat különböző mutációként jelenti az egyes variánsokat [pl. S466X(C>A) és S466X(C>G)]. A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat által jelentett 139 variáns listáját a 2. táblázat tartalmazza. Félkövér betűtípus = az ACMG-23 része; dőlt betűtípus = feltételesen jelentett.

2. táblázat: Cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat; a variánsok összefoglalása

[Genomikus koordináta szerinti sorrendben; az egyes variánsokhoz tartozó nukleotidszintű elváltozás zárójelben van.]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	R553X (c.1657C>T)	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	R560T (c.1679G>C)	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	R347P (c.1040G>C)	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
G85E (c.254G>A)	1213delIT (c.1081delIT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	1898+1G>A (c.1766+1G>A)	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X (c.1202G>A)	2143delIT (c.2012delIT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X (c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	2184delA (c.2052delA)	R1162X (c.3484C>T)
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	3659delC (c.3528delC)
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	A455E (c.1364C>A)	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
R117H (c.350G>A)	9S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	3849+10kbC>T (c.3717+12191C>T)
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) [†]	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
621+1G>T (c.489+1G>T)	S489X (c.1466C>A)	2585delIT (c.2453delIT)	3876delA (c.3744delA)
663delIT (c.531delIT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)
G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)
711+1G>T (c.579+1G>T)	I507del (c.1519_1521delATC)	E831X (c.2491G>T)	W1282X (c.3846G>A)
711+3A>G (c.579+3A>G)	F508del (c.1521_1523delICTT)	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delITA (c.1545_1546delITA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)

712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	N1303K (c.3909C>G)
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) [†]	2789+5G>A (c.2657+5G>A)	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	1717-1G>A (c.1585-1G>A)	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	G542X (c.1624G>T)	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R (c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>PolyTG/PolyT</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A>G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A>G)</i>
R334W (c.1000C>T)	G551D (c.1652G>A)	3120+1G>A (c.2988+1G>A)	<i>F508C (c.1523T>G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

[†] A CFTR2 adatbázisban¹² CF-et okozó variánsként van besorolva, míg Sosnay közleménye¹³ a variánst bizonytalannak minősíti. Az adatbázisban osztályozása aktuálisabb, és tükrözi a befejezett funkcionális tesztelést, amely Sosnay közleményének idején még nem állt rendelkezésre.

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat összefoglalása és magyarázata

A vizsgálat kialakítása

A vizsgálat kimutatja a CFTR gén valamennyi exonjának fehérjét kódoló területét és az ezekkel szomszédos intronok 10 nukleotidnyi területét is, három exon (7., 10. és 20.) kivételével. A 7. és a 10. exon esetében az exon 5' végén csak 5 nukleotidnyi szomszédos intronszekvenciát mutat ki, elkerülendő a proximális homopolimer indeleket. A 20. exon 5' végén 30 nukleotidnyi szomszédos intronszekvenciát mutat ki, hogy lehetővé tegye a 3272-26A>G mutáció kimutatását. Ezenkívül a vizsgálat kimutatja a kódoló terület 5' és 3' végével szomszédos, körülbelül 100 nukleotidnyi, translációra nem kerülő terület szekvenciáját is, valamint két, mélyen egy intronban elhelyezkedő mutációt (1811+1,6kb A>G és 3489+10kb C>T), illetve két nagy kiterjedésű deléciót (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) és a PolyTG/PolyT régiót. A vizsgálat által lefedett területek genomikus koordinátáit a [3. táblázat](#) tartalmazza.



MEGJEGYZÉS:

A deléciók kimutatására a vizsgálat által szekvenált régiókon belül bizonyos genomikus helyeken korlátozások érvényesek (lásd [A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat eljárásának korlátai](#), [9. oldal](#)).

3. táblázat: A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat által lefedett genomikus koordináták

	hg19 kezdő genomikus koordináta (7. kromoszóma)	hg19 befejező genomikus koordináta (7. kromoszóma)	Hosszúság (bázispár)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184

	hg19 kezdő genomikus koordináta (7. kromoszóma)	hg19 befejező genomikus koordináta (7. kromoszóma)	Hosszúság (bázispár)
CFTR_Exon 7 [^]	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10 [^]	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12 [*]	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20 [#]	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22 [*]	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Bázisok teljes száma			5203 ^{**}

[^] A 7. és a 10. exon esetében a vizsgálat az exon felső végén csak 5 nukleotidnyi szomszédos intronszekvenciát mutat ki, elkerülendő az itt található homopolimer szakaszokat. A 10. exon esetében ez a PolyT/Poly TG régió a 9. intronban. Ezt a területet a vizsgálat külön kezeli.

^{*} A mély intronikus mutációk esetében az SNV mellett mindkét oldalon található 5 nukleotid is leolvasásra kerül.

[#] A 20. exon 5' végén 30 nukleotidnyi szomszédos intronszekvenciát mutat ki, hogy lehetővé tegye a 3272-26A>G mutáció kimutatását.

^{**} A két nagy delécióval és a PolyTG/PolyT területekkel együtt ez összesen 5206 pozíciót jelent.

Az eljárás működési elve

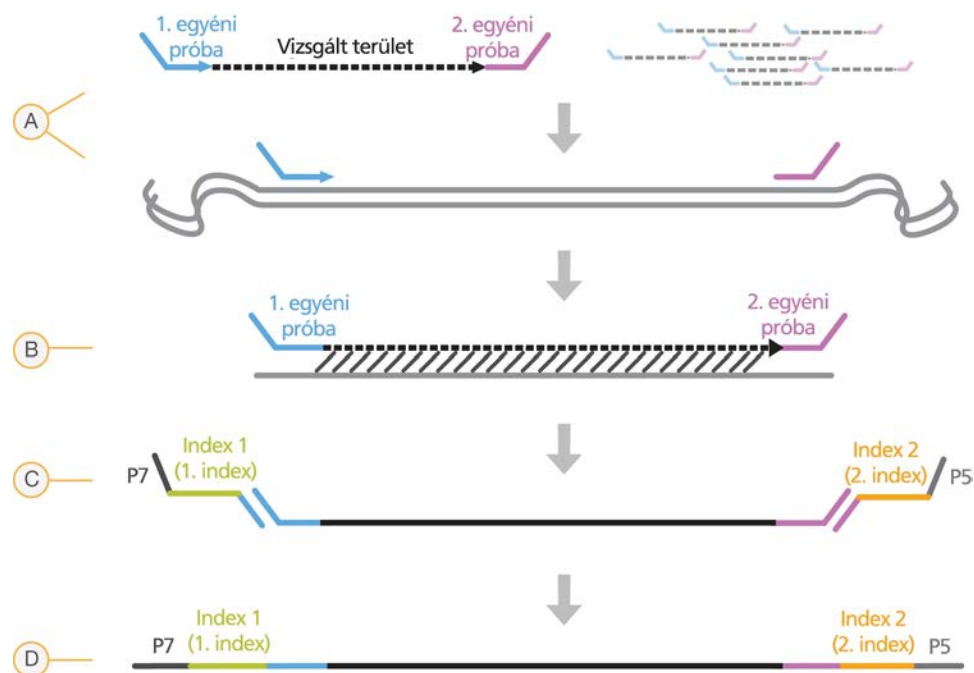
A TruSight cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek DNS-szekvenálásra szolgáló könyvtárak manuális elkészítésére szolgálnak perifériás teljesvér-mintából. A könyvtár-előkészítés négy fő lépésből áll: hibridizálás, extenzió-ligáció, PCR-amplifikáció és könyvtár-normalizálás.



MEGJEGYZÉS

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat könyvtár-előkészítési eljárása megegyezik.

Könyvtár-előkészítés



- A **Hibridizálás** – Az első lépés a hibridizálás, amely a bevitt genomikus DNS-nek a cisztás fibrózis géntől felfelé, illetve lefelé elhelyezkedő területekre specifikus oligonukleotidok keverékével történő hibridizálása. E folyamat végén méretszelektív szűrővel történő háromlépéses mosási eljárással eltávolításra kerülnek a genomikus DNS-hez nem kötődő oligonukleotidok.
- B **Extenzió-ligáció** – A második lépés, az extenzió-ligáció a vizsgált területtől felfelé és lefelé található hibridizált oligonukleotidok összekapcsolásából áll. Egy DNS-polimeráz meghosszabbítja a vizsgált területtől felfelé elhelyezkedő oligonukleotidszálat a vizsgált területen keresztül, majd ezt egy DNS-ligáz a lefelé elhelyezkedő oligonukleotid 5' végéhez kapcsolja. Ez olyan termékek létrehozását eredményezi, amelyek a cisztás fibrózis génjére specifikus oligonukleotidokat tartalmazzák az amplifikációhoz szükséges szekvenciákkal körülveve.
- C **PCR-amplifikáció** – A harmadik lépés a PCR-amplifikáció, az extenziós-ligációs termékek amplifikálása az indexszekvenciák hozzáadására való indexadapterekkel, amelyek a minta megsokszorozására és az MiSeqDx készüléken végzett klaszterképzésre szolgálnak. Az eljárás végén a PCR-tisztítási eljárással a PCR-termékek (más néven könyvtár) tisztítása történik.
- D **Könyvtár-normalizálás** – Az utolsó lépés a könyvtár-normalizálás, az egyes könyvtárak mennyiségének normalizálása a végleges, összekevert könyvtárban való egyenlő mennyiségük biztosítására. Az eljárás végén a könyvtárkeverék betöltése történik az MiSeqDx készülékbe SBS módszerrel végzett szekvenálás céljából.

Szekvenálás

Az SBS során az egyes nukleotidbázisok kimutatása reverzibilis terminációs módszerrel történik, amint azok beépülnek a növekvő DNS-szálakba. Minden szekvenálási ciklusban a nukleinsavlánchoz egy fluoreszcensen jelölt dezoxinukleotid-trifoszfátot (dNTP) adnak hozzá. A jelölt nukleotidnál megáll a polimerizáció, így minden egyes dNTP beépítése után a készülék képet készít a fluoreszcens festékről a bázis azonosításához, majd egy enzim lehasítja a festéket, lehetővé téve a következő nukleotid beépítését. Mivel mind a négy reverzibilis terminátorhoz kötött dNTP

(A, G, T, C) különálló molekulaként van jelen, ezek versengése minimalizálja a beépítési torzítást. A bázisok azonosítása közvetlenül a jelintenzitások mérésével történik minden szekvenálási ciklusban. Az eredmény a bázisonkénti szekvencia-meghatározás.

Adatok elemzése

Az adatok elemzésének első lépése az elsődleges elemzés. Ennek során a Valós idejű elemzési (RTA) szoftver bázisazonosítást és minőségi pontszám hozzárendelését végzi. A következő lépés, a másodlagos elemzés az elsődleges elemzéssel végzett bázisazonosításokat feldolgozza, és létrehozza az egyes mintákhoz tartozó információkat. A Local Run Manager szoftver által végzett másodlagos elemzés részét képezi a demultiplikálás, a FASTQ-fájlok létrehozása, az illesztés, a variánsok azonosítása és a VCF-fájlok létrehozása, amelyek a referenciagenom meghatározott helyein található variánsok adatait tartalmazzák.

- ▶ **Demultiplikálás** – Ha a futtatás több mintát és indexelt leolvasást tartalmaz, ez a másodlagos elemzés első lépése. A demultiplikálás szétválasztja az összekevert mintákból származó adatokat a PCR-amplifikációs lépés során hozzáadott egyedi szekvenciájú indexek alapján.
- ▶ **FASTQ-fájlok létrehozása** – A demultiplikálás után a Local Run Manager FASTQ formátumú közbenső elemzési fájlokat hoz létre, ez a szekvenciák megadására használt szöveges formátum. A FASTQ-fájlok tartalmazzák az egyes minták leolvasásait és a hozzájuk tartozó minőségi pontszámokat, a szűrőn át nem ment klaszterek kizárásával.
- ▶ **Illesztés** – Az illesztési lépésben a rendszer összehasonlítja a szekvenciákat a referenciával, hogy azonosítsa a szekvenciák közötti kapcsolatot, és pontszámot ad a területek hasonlósága alapján. Az illesztett leolvasásokat BAM formátumú fájlba írja. A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat során egy sávos Smith–Waterman-algoritmus végez helyi szekvenciaillesztést végez, hogy meghatározza a hasonló régiókat két szekvencia között.
- ▶ **Variánsazonosítás** – Ez a lépés rögzíti az egynukleotid-variánsokat (SNV), az inzerciókat és a deléciókat (indel), valamint az egyéb strukturális variánsokat egy szabványosított szöveges fájlban: a TruSightCF139VariantAssay.txt fájlban a cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt fájlban a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat esetében.

Az elemzési munkafolyamatról további tájékoztatás az MiSeqDx készülékre telepített elemzőszoftver dokumentációjában található. Lásd: *Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 1000000100945)*. Lásd: *Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 1000000100946)*. Lásd: *Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 Micro elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 200017946)*. Lásd: *Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 Micro elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 200017945)*.

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat eljárásának korlátai

- ▶ *In vitro* diagnosztikai használatra.
- ▶ A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálatlaltal kapott eredményeket egy teljes klinikai kivizsgálás összefüggésében kell használni és értelmezni.
- ▶ A vizsgálat rendeltetése szerint a CFTR gén ismert variánsainak egy bizonyos részhalmazát azonosítja, de nem tartalmazza a CFTR génben azonosított összes variánst. Konkrétan a vizsgálat csak akkor jelzi az aminosavszintű változásokat, ha azok a [2. táblázat](#) felsorolt nukleotidváltozásokhoz kapcsolódnak. Bár más nukleotidszintű változások is vezethetnek ugyanilyen aminosavszintű változásokhoz, ezeket a vizsgálat nem jelzi. Ezért ha nem sikerül variáns azonosítása, ez nem garantálja, hogy más CFTR-variáns nincs jelen az elemzett mintákban.
- ▶ Az ezzel a vizsgálatlaltal azonosított variánsok gyakorisága eltérő a különböző populációkban.
- ▶ Mint minden hibridizációalapú vizsgálat esetén, az oligonukleotid-kötő területeket érintő polimorfizmusok vagy variánsok befolyásolhatják a vizsgált allélokot és ezzel az azonosításokat.
- ▶ A vizsgálat nem tudja meghatározni, hogy a PolyTG/PolyT variáns cisz vagy transz irányban van-e az R117H variánshoz képest. Az R117H variánssal rendelkező betegek esetében további vizsgálatot kell végezni annak megállapítására, hogy a klinikai fenotípust befolyásoló PolyTG/PolyT variáns (pl. 12-13(TG) vagy 5T) cisz vagy transz helyzetben van-e az R117H variánshoz képest.

- ▶ A PolyTG/PolyT homopolimer régiókról ismert, hogy a polimeráz csúszása miatt nehezen értelmezhetőek szekvenciaalapú vizsgálatokkal. A PolyTG/PolyT eredmények 0,9%-a (4/448) helytelen azonosítást: ± 1 TG eltérést mutattak a Sanger-féle kétirányú szekvenálással összehasonlítva (16. táblázat).

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat eljárásának korlátai

- ▶ *In vitro* diagnosztikai használatra.
- ▶ A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálatnál kapott eredményeket egy teljes klinikai kivizsgálás összefüggésében kell használni és értelmezni.
- ▶ A vizsgálat a CFTR gén következő területeit szekvenálja:
 - ▶ A CFTR gén 27 exonjában található, fehérjét kódoló területet.
 - ▶ Az ezekkel szomszédos intronok 5–10 nukleotidnyi területét.
 - ▶ A translációra kerülő terület 5' és a 3' végével szomszédos, körülbelül 100 nukleotidnyi intronszekvenciát.
 - ▶ Két, mélyen egy intronban elhelyezkedő mutációt (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T).
 - ▶ A 9. intronban található PolyTG/PolyT szekvenciát.
 - ▶ A gén 188 702 bázispárjából összesen 5 206 pozíciót/területet.
- ▶ A vizsgálat szekvenálja a CFTR gén fehérjét kódoló területeit és intron/exon-határterületeit, azonban nem szekvenálja az összes intront és mindegyik nagy deléciót. Így a teljesen vad típusú eredmény nem garantálja, hogy a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia szabályozó (CFTR) gén más mutációi/variánsai nincsenek jelen az elemzett mintákban.
 - ▶ A vizsgálat két meghatározott, nagy kiterjedésű deléció (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) azonosítására alkalmas. A vizsgálat nem képes más nagy méretű deléciókat kimutatni vagy jelenteni. Ez a vizsgálat csak a legfeljebb 3 bp méretű inzerciók és deléciók kimutatására van hitelesítve.
- ▶ A homopolimer régiókban minden inzerció/deléció balra van igazítva, míg a HGVS szerinti elnevezésben jobbra van igazítva. Például a c.313delA variáns (a GAATC szekvencia kontextusában) G-ATC delécióként van azonosítva, míg a dbSNP-ben GA-TC delécióként szerepel. Kivételt képez ezalól a CFTR2 adatbázisban betegséget okozóként felsorolt 135 variáns (a variáns-adatbázis 2012. 10. 04-i verziója alapján). A variánsok csoportjában a homopolimer régiókban található összes indel jelentése megfelel a CFTR2 szerinti várható elnevezésnek.¹³
- ▶ A vizsgálat által szekvenált régiókon belül bizonyos genomikus helyeken a deléciók kimutatására korlátozások érvényesek. A 4. táblázat tartalmazza azokat a genomikus koordinátákat, amelyeknél a vizsgálat nem tud deléciókat jelenteni. A vizsgálat nem tudja kimutatni azokat a deléciókat, amelyek a korlátozás helyét tartalmazó oszlopban szereplő bázist vagy bázisokat tartalmazzák.

4. táblázat: Azok a genomikus koordináták, amelyeken nem lehet deléciókat kimutatni

CFTR gén területe	hg19 genomikus koordináta (7. kromoszóma)
CFTR_Exon1	117120041; 117120211
CFTR_Exon3	117149091
CFTR_Exon4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Exon5	117174362
CFTR_Exon6	117175417
CFTR_Exon7	117176621
CFTR_Exon8	117180176-117180177*
CFTR_Exon9	117182126
CFTR_Exon10	117188771
CFTR_Exon11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Exon12	117227802

CFTR gén területe	hg19 genomikus koordináta (7. kromoszóma)
CFTR_Exon14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Exon17	117243705; 117243843
CFTR_Exon18	117246751
CFTR_Exon19	117250688
CFTR_Exon20	117251788
CFTR_Exon22	117267721
CFTR_Exon23	117282597
CFTR_Exon24	117292953
CFTR_Exon25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Exon26	117305518
CFTR_Exon27	117307178

* Csak olyan deléciókat nem lehet kimutatni, amelyek mindkét itt felsorolt bázist tartalmazzák. Például a 8. exonban csak a 117180176 és 117180177 genomikus koordinátáknál lévő bázisokat tartalmazó, ≥ 2 bp méretű deléciókat nem lehet kimutatni. A 117180176 vagy 117180177 helyen történt, egyetlen bázist érintő deléció kimutatható.

- ▶ Ha a **4. táblázat** felsorolt érintett koordináta egy homopolimer terület balról első bázisa, akkor a homopolimer szakaszon belüli bármely más pozícióban bekövetkező deléciót nem lehet kimutatni, mivel az nem különböztethető meg az érintett koordinátán bekövetkező deléciótől.
- ▶ A vizsgálat összesen öt, a ClinVar klinikai adatbázisban (2014 decemberi verzió) felsorolt variánst nem tud kimutatni. Ez az öt variáns az **5. táblázat** található. E korlátozás által érintett variánsok egyike sem szerepel a CFTR2 adatbázisban (2012. 10. 04-i verzió). Egyik variáns esetében sem volt elérhető a gyakoriságra vonatkozó adat.

5. táblázat: A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálattal nem kimutatható ismert variánsok

Variáns száma	ClinVar azonosító	CFTR gén területe	Genomikus hely (7. kromoszóma)	cDNS-név (HGVS)	Fehérjeszintű név (HGVS)	rs-azonosító
1	RCV000046424	CFTR_Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

* Ezekben az esetekben az érintett koordináták egy homopolimer régióba esnek.

- ▶ Az ezzel a vizsgálattal azonosított variánsok gyakorisága eltérő a különböző populációkban. Nem lehetséges a CFTR gén ezzel a vizsgálattal kimutatható összes variánskombinációjának validálása. A felhasználónak javasolt az új és ritka variánsokat validált referencia-módszerrel megerősítenie.
- ▶ Mint minden hibridizációalapú vizsgálat esetén, az oligonukleotid-kötő területeket érintő polimorfizmusok, mutációk, inzerciók és deléciók befolyásolhatják a vizsgált allélokot és ezzel az azonosításokat.
- ▶ Az olyan összetett variánsokat, amelyek esetében egy deléció és egy inzerció ugyanazon a területen történik, a vizsgálat két különálló, egymáshoz közel elhelyezkedő variánsként tudja jelenteni. A variáns fázisát nem értékeli a vizsgálat, és a kimutatott szekvencia többi lehetséges megoldását is figyelembe kell venni. Egy ilyen összetett variáns példáját lásd a **6. táblázat**.

6. táblázat: Összetett variáns példája

Szekvenciakontextus (referencia)	GAAGAAATT
A variáns megfigyelt szekvenciája	GAAT -- ATT
Várt variáns	GAA deléciója, T inzerciója (mindkét változás ugyanazon a kromoszómán)
A vizsgálat által jelentett variáns(ok)	SNP (G>T); AA deléciója

- ▶ Ha egy mintában kettőnél több variáns azonosítása történik, ajánlott, hogy a felhasználó ellenőrizze az eredményt az MiSeqDx készülékkel végzett szekvenálás ismételt elvégzésével friss gDNS-kivonattal, hogy kizárható legyen a minta keresztkontaminációja.

**MEGJEGYZÉS**

Kettőnél több variáns kimutatása esetén megfontolandó a haplotípus-fázishatás lehetősége. A vizsgálat nem tudja meghatározni, hogy az egyes variánsok cisz vagy transz irányban vannak-e más variánsokhoz képest.

- ▶ A vizsgálat nem tudja meghatározni, hogy a PolyTG/PolyT variáns cisz vagy transz irányban van-e más variánsokhoz képest. Az R117H variánssal rendelkező betegek esetében további vizsgálatot kell végezni annak megállapítására, hogy a klinikai fenotípust befolyásoló PolyTG/PolyT variáns (pl. 12-13(TG) vagy 5T) cisz vagy transz helyzetben van-e. A PolyTG/PolyT homopolimer régiókról ismert, hogy a polimeráz csúszása miatt nehezen szekvenálhatók.

A termék összetevői

A TruSight cisztás fibrózis készlet az alábbi összetevőket tartalmazza:

- ▶ TruSight cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek (katalógusszám: 20036925)

Szállított reagensek

A TruSight cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek részét képező reagenseket az Illumina szállítja. A készlet 1–4 használathoz, készletenként legfeljebb 96 mintához elegendő.

TruSight cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek, 1. doboz

Az 1. doboz reagensei fagyasztva kerülnek szállításra, és -25 °C és -15 °C között tárolva stabilak. A reagensek stabilak a feltüntetett lejárati időig, legfeljebb 6 fagyasztási-felolvasztási ciklussal.

7. táblázat: 1A doboz, amplifikáció előtti reagensek

Komponens	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolás
Cisztás fibrózis oligonukleotid-keverék	1 cső	600 µl	A <i>CTFR</i> gént megcélzó oligonukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat.	-25 °C és -15 °C között
Hibridizációs puffer	1 cső	4,32 ml	Sókat és formamidot tartalmazó pufferelt vizes oldat.	-25 °C és -15 °C között
Extenziós-ligációs keverék	1 cső	4,8 ml	DNS-polimerázok, DNS-ligáz és dNTP-k jogvédett összetételű keverékét tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
2. index primerei: (A501–A508)	1 cső/primer	192 µl	PCR-primerek indexszekvenciákkal és szekvenálási adapterekkel.	-25 °C és -15 °C között
1. index primerei: (A701–A712)	1 cső/primer	128 µl	PCR-primerek indexszekvenciákkal és szekvenálási adapterekkel.	-25 °C és -15 °C között
PCR-polimeráz	1 cső	56 µl	Jogvédett DNS-polimeráz.	-25 °C és -15 °C között

Komponens	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolás
PCR-főkeverék	1 cső	2,8 ml	Sókat és dNTP-t tartalmazó pufferelt vizes oldat.	-25 °C és -15 °C között

8. táblázat: 1B doboz, amplifikáció után használatos reagensek

Komponens	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolás
Könyvtár-normalizálási hígítószer	1 cső	4,6 ml	Sókat, 2-merkaptóetanolt és formamidot tartalmazó pufferelt vizes oldat.	-25 °C és -15 °C között
Könyvtárhígítási puffer	1 cső	4,5 ml	Pufferelt vizes oldat.	-25 °C és -15 °C között
PhiX belső kontroll	1 cső	10 µl	PhiX genomikus DNS-t tartalmazó pufferelt vizes oldat.	-25 °C és -15 °C között

TruSight tisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek, 2. doboz

A 2. doboz reagensei környezeti hőmérsékleten kerülnek szállításra, és 15 °C és 30 °C között tárolva a feltüntetett lejáratú időig stabilak.

9. táblázat: 2. doboz, amplifikáció előtti reagensek

Komponens	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolás
Szűrőlemez	4 lemez	N.a.	Polipropilén mikrotiterlemez módosított poliéterszulfon-membránnal.	15 °C és 30 °C között

10. táblázat: 2. doboz, amplifikáció utáni reagensek

Komponens	Darab	Töltési térfogat (ml)	Hatóanyagok	Tárolás
Elúciós puffer	1 cső	4,8	Pufferelt vizes oldat	15 °C és 30 °C között
Könyvtártároló puffer	1 cső	3,5	Pufferelt vizes oldat	15 °C és 30 °C között

TruSight tisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek, 3. doboz

A 3. doboz reagensei hűtve kerülnek szállításra, és 2 °C és 8 °C között tárolva a feltüntetett lejáratú időig stabilak.

11. táblázat: 3A doboz, amplifikáció előtti reagensek

Komponens	Darab	Töltési térfogat (ml)	Hatóanyagok	Tárolás
Erőteljes mosópuffer	1 üveg	24	Sókat, 2-merkaptóetanolt és formamidot tartalmazó pufferelt vizes oldat.	2 °C és 8 °C között
Univerzális mosópuffer	1 cső	4,8	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat.	2 °C és 8 °C között

12. táblázat: 3B doboz, amplifikáció után használatos reagensek

Komponens	Darab	Töltési térfogat (ml)	Hatóanyagok	Tárolás
PCR-tisztító gyöngyök	1 cső	5	Szilárd fázisú paramágneses gyöngyöket és polietilén-glikolt tartalmazó pufferelt vizes oldat.	2 °C és 8 °C között
Könyvtár-normalizálási mosószer	2 cső	4,8	Sókat, 2-merkaptóetanolt és formamidot tartalmazó pufferelt vizes oldat.	2 °C és 8 °C között
Könyvtárgyöngyök	1 cső	1,2	Szilárd fázisú paramágneses gyöngyöket tartalmazó pufferelt vizes oldat.	2 °C és 8 °C között

Szükséges, de nem szállított reagensek

Amplifikáció előtt használatos reagensek

- ▶ 10 N NaOH (készítse tablettákból vagy standard oldatból)
- ▶ TE-puffer
- ▶ RN-áz-/DN-áz-mentes víz

Amplifikáció után használatos reagensek

- ▶ 10 N NaOH (készítse tablettákból vagy standard oldatból)
- ▶ 100%-os, molekuláris biológiai használatra szolgáló etanol (EtOH)
- ▶ TE-puffer
- ▶ RN-áz-/DN-áz-mentes víz

MiSeqDx reagensek

- ▶ MiSeqDx reagenskészlet v3 (katalógusszám: 20012552 vagy 20037124, az országtól függően) vagy MiSeqDx reagenskészlet v3 Micro (katalógusszám: 20063860)
- ▶ 5%-os nátrium-hipoklorit
- ▶ Tween 20
- ▶ Laboratóriumi minőségű víz

Tárolás és kezelés

- 1 A szobahőmérséklet a 15 °C és 30 °C közötti hőmérsékletet jelenti.
- 2 A hibridizációs pufferben, az erőteljes mosópufferben és a könyvtár-normalizálási hígítószerben látható csapadék vagy kristályok keletkezhetnek. Használat előtt a reagenst alaposan vortexelje, majd megtekintéssel ellenőrizze, hogy nincs csapadék.
- 3 A PCR-tisztító gyöngyök és a könyvtárgyöngyök kezelésekor tartsa be a legjobb gyakorlatot:
 - ▶ A gyöngyöket soha nem szabad fagyasztani.
 - ▶ Hagyja, hogy a gyöngyök elérjék a szobahőmérsékletet.
 - ▶ Közvetlenül a használat előtt vortexelje a gyöngyöket, amíg jól szuszpendálódnak, és a színük homogén.
 - ▶ A gyöngyök hozzáadása után a minta alapos összekeveréséhez pipettázza 10-szer fel és le. A minták erőteljes összekeveréséhez használható rázó készülék.
 - ▶ A gyöngyök és a minták keverékét inkubálja szobahőmérsékleten a teljes megadott időtartamig.
 - ▶ A mágneses állvány használatakor kövesse az utasításokat. Felszívás előtt várja meg az oldat kitisztulását. A felülúszó lassú leszívása közben tartsa a lemezt a mágneses állványon, és ügyeljen arra, hogy ne zavarja fel az elvált gyöngyöket.
- 4 Ne fagyassza le a könyvtárgyöngyöket, és ne keverje össze a könyvtár-normalizálási hígítószerrel, ha nem használja fel azonnal.

Eszközök és anyagok

Külön szállított berendezések és anyagok

- ▶ MiSeqDx készülék, katalógusszám: DX-410-1001
- ▶ TruSeq indexlemez-rögzítőkészlet, cikkszám: FC-130-1005
- ▶ TruSeq indexlemez-rögzítő- és -peremkészlet, cikkszám: FC-130-1007

- ▶ Indexadapter-cserepakok, cikkszám: DX-502-1003
- ▶ MiSeq cső, katalógusszám: MS-102-9999

Szükséges, de nem szállított eszközök és anyagok

Amplifikáció előtti berendezések és anyagok

- ▶ **Fűtőblokk** – Egy 96 üregű lemezhez való fűtőblokk szükséges. A fűtött fedelű fűtőblokkok használata elfogadható. A hibridizációs lépéshez nem javasolt aktív hűtéses inkubátor vagy fűtőblokk (például Peltier, termoelektromos hűtésű) használata. A passzív lehűlési lépés döntő jelentőségű a megfelelő hibridizációhoz. A fűtőblokknak meg kell felelnie az alábbi teljesítményspecifikációknak:
 - ▶ Hőmérséklet-tartomány: környezeti, +5 °C és 99 °C között
 - ▶ Hőmérséklet-szabályozás: $\pm 0,1$ °C 37 °C-on; $\pm 0,4$ °C 60 °C-on
- ▶ **Mintainkubátor** – Egy inkubátor (hibridizációs kemence) szükséges. Az inkubátornak meg kell felelnie az alábbi teljesítményspecifikációknak:
 - ▶ Hőmérséklet-tartomány: 10 °C és 100 °C között
 - ▶ Hőmérséklet-szabályozás: $\pm 0,2$ °C
- ▶ **Asztali centrifuga** – Egy 20 °C hőmérséklet fenntartására alkalmas hőmérséklet-szabályozott asztali centrifuga szükséges. Külön centrifuga szükséges az amplifikáció utáni területen. Bármilyen lemezcentrifuga elfogadható, amelybe behelyezhető egy szűrőegységgel ellátott 96 üregű lemez, és alkalmas a protokollban megadott sebességeken (280–2400 g) való működésre.
- ▶ **Precíziós pipetták** – Egy precíziós pipettakészlet szükséges. Egy másik készlet szükséges az amplifikáció utáni területen. A precíziós pipetták használata a reagensek és minták pontos adagolásának biztosításához szükséges. Egycsatornás vagy többcsatornás pipetták is használhatók, ha azokat rendszeresen kalibrálják, és a pontosságuk megadott térfogat 5%-án belül van.
- ▶ **Fogyóeszközök** – A következő fogyóeszközök szükségesek:
 - ▶ 96 üregű peremes PCR-lemezek, 0,2 ml, polipropilén vagy azzal egyenértékű
 - ▶ 96 üregű tárolólemezek, 0,8 ml (MIDI-lemezek)
 - ▶ Oldatkád, PVC, DNÁZ- és RN-áz-mentes (vályú)
 - ▶ Öntapadós alumínium zárófolia
 - ▶ Megfelelő, PCR-lemezhez való zárófolia
 - ▶ Aeroszolálló pipettahegyek
 - ▶ Kúpos csövek, 15 ml

Amplifikáció utáni berendezések és anyagok

- ▶ **Inkubátor** – Egy inkubátor szükséges. Az inkubátornak fűtött fedéllel kell rendelkeznie, és a következő teljesítményspecifikációknak kell megfelelnie:
 - ▶ Hőmérséklet-szabályozási tartomány: 4 °C és 99 °C között
 - ▶ Szabályozás pontossága: $\pm 0,25$ °C 35 °C és 99 °C között
- ▶ **Mikrolemezrázó** – Egy mikrolemezrázó szükséges az amplifikáció utáni laboratóriumi területen. A lemezrázónak meg kell felelnie a következő teljesítményspecifikációknak:
 - ▶ Maximális keverési sebesség: 3000 rpm
 - ▶ Keverési sebesség tartománya: 200–3000 rpm
- ▶ **Asztali centrifuga** – Egy 20 °C hőmérséklet fenntartására alkalmas asztali centrifuga szükséges. Külön centrifuga szükséges az amplifikáció előtti területen. Bármilyen lemezcentrifuga elfogadható, amely alkalmas a protokollban megadott sebességeken (280–2400 g) való működésre.
- ▶ **Fűtőblokk** – Egy csövekhez való fűtőblokk szükséges. A fűtőblokknak meg kell felelnie az alábbi teljesítményspecifikációknak:
 - ▶ Hőmérséklet-tartomány: környezeti, +5 °C és 99 °C között
 - ▶ Hőmérséklet-szabályozás: $\pm 0,1$ °C 37 °C-on; $\pm 0,4$ °C 60 °C-on

- ▶ **Mágneses állvány** – Egy 96 csöves lemezhez való mágneses állvány szükséges. Jobb teljesítmény tapasztalható, ha a mágnesek az állvány oldalán, nem pedig az alján helyezkednek el.
- ▶ **Precíziós pipetták** – Egy precíziós pipettakészlet szükséges. Egy másik készlet szükséges az amplifikáció előtti területen. A precíziós pipetták használata a reagensek és minták pontos adagolásának biztosításához szükséges. Egycsatornás vagy többcsatornás pipetták is használhatók, ha azokat rendszeresen kalibrálják, és a pontosságuk megadott térfogat 5%-án belül van.
- ▶ **Asztali centrifuga** – Mikrocentrifuga-csövek befogadására alkalmas, 20 °C-os hőmérséklet tartására alkalmas hőmérséklet-szabályozott centrifuga szükséges. Bármilyen centrifuga elfogadható, amely alkalmas a protokollban megadott sebességeken (280–1000 g) való működésre.
- ▶ **Fogyóeszközök** – A következő fogyóeszközök szükségesek:
 - ▶ 96 üregű peremes PCR-lemezek, 0,2 ml, polipropilén vagy azzal egyenértékű
 - ▶ 96 üregű tárolólemezek, 0,8 ml (MIDI-lemezek)

**MEGJEGYZÉS**

Ügyeljen arra, hogy a 96 üregű lemez kompatibilis legyen a mágneses állvánnyal.

- ▶ Kúpos csövek, 15 ml és 50 ml
- ▶ Mikrocentrifuga-csövek (ajánlott a csavaros fedelű)
- ▶ Nyolc PCR-csövet tartalmazó csík
- ▶ Oldatkádák, PVC, DN-áz- és RN-áz-mentes (vályú)
- ▶ Öntapadós alumínium zárófoliák
- ▶ Egyszer használatos öntapadós lemezfoliák
- ▶ Aeroszolálló pipettahegyek

Mintavétel, -szállítás és -tárolás

**MEGJEGYZÉS**

Minden mintát potenciálisan fertőző anyagként kell kezelni.

- ▶ Használhatók K₂EDTA-csőbe levett teljesvér-minták.
- ▶ A teljesvér-minták legfeljebb 7 napig tárolhatók szobahőmérsékleten, legfeljebb 30 napig 2 °C és 8 °C között vagy 30 napig -25 °C és -15 °C között.
- ▶ A teljesvér-minták szállíthatók legfeljebb 7 napig szobahőmérsékleten, 30 napig 2 °C és 8 °C között, illetve 30 napig -25 °C és -15 °C között. A teljes vér szállítását a betegségek terjesztésére alkalmas anyagokra vonatkozó országos és helyi előírásoknak megfelelően kell végezni.
- ▶ Nem tapasztalták a vizsgálat teljesítményének romlását, ha a genomikus DNS-en 6 lefagyasztási-felolvasztási ciklust végeztek.
- ▶ Nem tapasztalták a vizsgálat teljesítményének romlását, ha a vérmintában magasabb koncentrációban volt jelen bilirubin, koleszterin, triglicerid, EDTA vagy hemoglobin.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

**FIGYELEM!**

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



VIGYÁZAT!

Ezek a reagensek potenciálisan veszélyes vegyszereket tartalmaznak. Belélegzésük, lenyelésük, bőrrel érintkezésük és szembe kerülésük esetén személyi sérülést okozhatnak. Viseljen védőfelszerelést, így védőszemüveget, kesztyűt és laborköpenyt a kockázat mértékének megfelelően. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a regionális, országos és helyi törvényeknek és előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. További környezetvédelmi, egészségügyi és biztonsági információkért tekintse meg a következő címen elérhető biztonsági adatlapot: support.illumina.com/sds.html. (További információkért lásd: *Szállított reagensek*, 11. oldal.)

- ▶ A vizsgálat egyes összetevői redukálószerként 2-merkaptóetanolt tartalmaznak. Belélegzésük, lenyelésük, bőrrel érintkezésük és szembe kerülésük esetén személyi sérülést okozhatnak. Használja jól szellőző helyiségben, és az edényeket és a nem használt összetevőket a hatályos országos előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. További környezetvédelmi, egészségügyi és biztonsági információkért tekintse meg a következő címen elérhető biztonsági adatlapot: support.illumina.com/sds.html. (További információkért lásd: *Szállított reagensek*, 11. oldal.)
- ▶ A vizsgálat egyes összetevői formamidot tartalmaznak; ez egy alifás amid, amely valószínűleg toxikus hatást gyakorol a reprodukciós szervekre. Belélegzésük, lenyelésük, bőrrel érintkezésük és szembe kerülésük esetén személyi sérülést okozhatnak. Viseljen védőfelszerelést, így védőszemüveget, kesztyűt és laboratóriumi köpenyt. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a hatósági biztonsági előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. További környezetvédelmi, egészségügyi és biztonsági információkért tekintse meg a következő címen elérhető biztonsági adatlapot: support.illumina.com/sds.html. (További információkért lásd: *Szállított reagensek*, 11. oldal.)
- ▶ A termékkel kapcsolatos súlyos eseményeket haladéktalanul jelentse az Illumina vállalatnak és a felhasználó és/vagy a páciens lakhelye szerinti tagállam illetékes hatóságának.
- ▶ Minden mintát potenciálisan fertőző anyagnak kell kezelni.
- ▶ Az eljárások követésének elmulasztása hibás eredményeket vagy a minta minőségének jelentős romlását okozhatja.
- ▶ Használja a rutinszerű laboratóriumi óvintézkedéseket. Ne pipettázzon szájjal. Ne étkezzon, igyon vagy dohányozzon a munkaterületként megjelölt területeken. A minták és a vizsgálati reagensek kezelésekor viseljen eldobható kesztyűt és laborköpenyt. A minták és a vizsgálati reagensek kezelését követően alaposan mosson kezet.
- ▶ Ne használja a vizsgálat összetevőit a doboz címkéjén feltüntetett lejárat dátum után. Ne használjon különböző tételbe tartozó vizsgálati komponenseket. A tétel a vizsgálat dobozában címkéjén van feltüntetve.
- ▶ A minták vagy reagensek lebomlásának megelőzéséhez ügyeljen arra, hogy a protokoll megkezdése előtt az összes nátrium-hipoklorit gőz teljesen eltávozzon.
- ▶ Megfelelő laboratóriumi gyakorlat és jó laboratóriumi higiénia szükséges annak megelőzéséhez, hogy a PCR-termékek szennyezzék a reagenseket, az eszközöket és a genomikus DNS-mintákat. A PCR-termékekkel való szennyeződés pontatlan és megbízhatatlan eredményeket okozhat.
- ▶ A szállított reagensek fizikai jellemzőinek a megváltozása az anyagok romlását jelezheti. Ne használjon olyan reagenst, amelynek a fizikai jellemzői megváltoznak (például a színe jól látható módon megváltozik, vagy mikrobiológiai szennyeződésre utaló zavarosság látható).
- ▶ A szennyeződés elkerülése érdekében fizikailag válassza el az amplifikáció előtti és az azutáni területeket, és a két területen külön készülékek legyenek (például pipetták, pipettahegyek, vortexelő és centrifuga).
- ▶ Kerülje el a keresztszennyeződést. Az egyes minták között és az egyes reagensek között használjon új pipettahegyeket. Keverje össze a mintákat pipettával, illetve centrifugálja a lemezt, ha az van megadva. Ne vortexelje a lemezeket. Az aeroszolálló pipettahegyek használata csökkenti az amplitonok átvitelét és az egyes minták közötti keresztszennyeződést.
- ▶ Az index-minta párosításnak meg kell egyeznie az MiSeqDx készüléken végzett futtatáshoz megadott mintaadatokkal. A mintaadatok és a lemezelrendezés közötti eltérés esetén nem történik meg a pozitív minták azonosítása, és a rendszer helytelen eredményeket jelent.
- ▶ A mosási lépésekhez mindig frissen készítsen 80%-os etanololdatot. Az etanol vizet vehet fel a levegőből, ami befolyásolhatja az eredményeket.

- ▶ A mágnesállványon elvégzett lépés után tartsa be a megadott száradási időt, hogy biztosítsa az etanol teljes mértékű elpárolgását. A megmaradt etanol befolyásolhatja a későbbi reakciók teljesítményét.
- ▶ A vizsgálat összetevőit a megadott hőmérsékleten, a kijelölt amplifikáció előtti vagy amplifikáció utáni területen tárolja.
- ▶ Az 1. doboz összetevőinek többszöri (legfeljebb 6-szori) fagyasztása és felolvasztása nem veszélyezteti a vizsgálat integritását.
- ▶ Ne keverje össze a cisztás fibrózis oligonukleotid-keveréket és a hibridizációs puffert tárolás céljából. Ezek összekeverése esetén a cisztás fibrózis oligonukleotid-keverék instabillá válik, még akkor is, ha fagyasztva tárolják.
- ▶ A hibridizációs lépéshez nem javasolt aktív hűtéses inkubátor (például Peltier, termoelektromos hűtésű) használata. A passzív lehűlési lépés döntő jelentőségű a megfelelő hibridizációhoz.
- ▶ A PCR-polimerázt mindig csak közvetlenül a használat előtt adja PCR-főkeverékhez. Ne tárolja az összeállított főkeveréket.
- ▶ A könyvtár-normalizálási lépés során rendkívül fontos a könyvtárgyöngyöket tartalmazó pellet reszuszpendálása. Ez elengedhetetlen fontosságú ahhoz, hogy az MiSeqDx készülék áramlási cellájában konzisztens klasztersűrűség alakuljon ki.
- ▶ A könyvtár-normalizálási lépés során tartsa be a megadott inkubációs időket. A nem megfelelő inkubáció befolyásolhatja a könyvtárak reprezentációját és a klasztersűrűséget.
- ▶ A lemezek közötti átvitelek száma és az ezzel járó szennyeződések veszélye miatt fordítson különös gondot arra, hogy az üregek tartalma az üregeken belül maradjon. Ügyeljen, hogy a folyadékok ne loccsanjanak ki.
- ▶ Az ajánlott 250 ng bemeneti DNS-mennyiség lehetővé teszi a mennyiség változtatását. A bemeneti mennyiség befolyásolja a vizsgálat teljesítményét.
- ▶ A vizsgálati jelentésben a No Call (Sikertelen azonosítás) jelöléssel ellátott mintavariánsok azt jelzik, hogy a variáns pozíciójára vonatkozó adatok nem feleltek meg a meghatározott szekvenálási határértékeknek. Ne jelentse a No Call (Sikertelen azonosítás) megjelölésű variánsokat, kivéve, ha az ismételt vizsgálat a No Call (Sikertelen azonosítás) helyett a meghatározott határértékeknek megfelelő értékeket eredményez.

Rövidítések

13. táblázat: A TruSight cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékekkel kapcsolatban használt rövidítések

Rövidítés	Definíció
AMP	Amplifikációs lemez (AMplification Plate)
CLP	Tisztítási lemez (CLEan-up Plate)
DAL	Hígított amplikonkönyvtár (Diluted Amplicon Library)
FPU	Szűrőlemez egység (Filter Plate Unit)
HYB	Hibridizációs lemez (HYBridization Plate)
LNP	Könyvtár-normalizálási lemez (Library Normalization Plate)
NTC	Nincs templátkontroll
PAL	Kevert amplikonkönyvtár (Pooled Amplicon Library)
SGP	Tárolási lemez (StoraGe Plate)

További információforrások

Az Illumina weboldalán a TruSight Cystic Fibrosis támogatási oldalakon szoftverek, képzési anyagok, termékkompatibilitási információk és az alábbi dokumentáció található. A legfrissebb verziókért minden esetben látogasson el a támogatási oldalakra.

Információforrás	Leírás
<i>Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 1000000100945)</i>	A CF 139 variáns 2.0 elemzési modul szekvenálási és elemzési paramétereinek beállítására vonatkozó utasításokat tartalmazza.
<i>Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 1000000100946)</i>	A CF klinikai szekvenálási 2.0 elemzési modul szekvenálási és elemzési paramétereinek beállítására vonatkozó utasításokat tartalmazza.
<i>Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 Micro elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 200017946)</i>	A CF 139 variáns 2.0 Micro elemzési modul szekvenálási és elemzési paramétereinek beállítására vonatkozó utasításokat tartalmazza.
<i>Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 Micro elemzési modul munkafolyamati útmutató (dokumentumszám: 200017945)</i>	A CF klinikai szekvenálási 2.0 Micro elemzési modul szekvenálási és elemzési paramétereinek beállítására vonatkozó utasításokat tartalmazza.
<i>Az MiSeqDx készüléken futó Local Run Manager szoftver referencia-útmutatója (dokumentumszám: 1000000011880)</i>	Az MiSeqDx készüléken a futtatás létrehozására, az állapot követésére, a szekvenálási adatok elemzésére és az eredmények megtekintésére vonatkozó utasításokat tartalmazza.
<i>MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v2-höz (dokumentumszám: 1000000021961)</i>	Az MiSeqDx készülék beállítására és a szekvenálási futtatásokra vonatkozó utasításokat tartalmaz, beleértve az MiSeqDx készülék karbantartási eljárásait is.

Az eljárással kapcsolatos megjegyzések

- ▶ Az Illumina megköveteli, hogy minden futtatás alkalmával egy pozitív kontroll DNS minta és egy negatív kontroll (NTC = nincs kontrollminta-sablon) is feldolgozásra kerüljön egyidejűleg. A pozitív kontrollként szolgáló DNS-mintának jól jellemzett, a CFTR egy vagy több ismert variánsát tartalmazó mintának kell lennie. Az Illumina egy vad típusú kontroll használatát is javasolja. A vad típusú kontrollt a minták között kell futtatni, nem pedig a pozitív vagy a negatív kontroll helyett.
- ▶ A vizsgálat összetevőit a megadott hőmérsékleten, a kijelölt amplifikáció előtti vagy amplifikáció utáni területen tárolja.
- ▶ Az 1. doboz összetevőinek többszöri (legfeljebb 6-szori) fagyasztása és felolvasztása nem veszélyezteti a vizsgálat integritását.

Minta-előkészítés

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat vagy a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat megkezdése előtt ki kell vonni a DNS-t a teljes vérből, és meg kell határozni a mennyiségét.

- ▶ Használható bármilyen hitelesített DNS-kivonási módszer.
- ▶ A DNS mennyiségének meghatározását spektrofotométerrel kell végezni. Győződjön meg arról, hogy a DNS-minta A260/A280 értéke > 1,5. Normalizálja a DNS-mintát 50 ng/μl koncentrációra. Minden mintához 5 μl genomikus DNS (összesen 250 ng) szükséges.

Mintafeldolgozási teljesítmény

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat esetében az MiSeqDx készüléken történő futtatás az MiSeqDx Reagent Kit v3 reagenskészlettel 24–96 mintával történhet, illetve az MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro reagenskészlettel 24–36 mintával. A PCR-amplifikáció során használt indexprimereket a kívánt végső mintafeldolgozási teljesítmény alapján kell kiválasztani, hogy minden könyvtárnak egyéni indexkombinációja legyen.



MEGJEGYZÉS

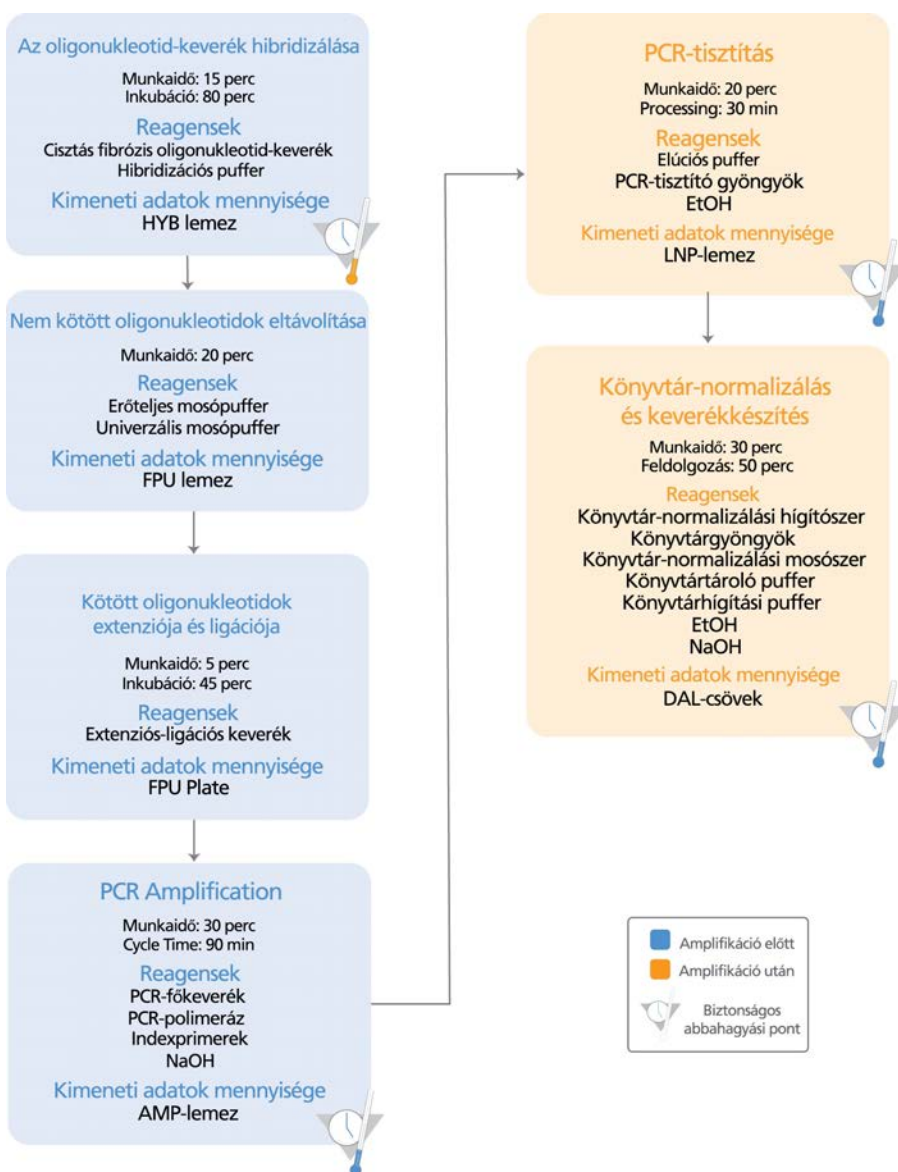
A 24-nél kevesebb mintával történő futtatást az Illumina nem validálta.

Könyvtár-előkészítési munkafolyamat

A következő ábra bemutatja a cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat könyvtár-előkészítési munkafolyamatát. Az amplifikáció előtti lépések a következők: Az oligonukleotid-keverék hibridizálása, a nem kötött oligonukleotidok eltávolítása és a kötött oligonukleotidok extenziója és ligációja. A PCR-amplifikáció lépésénél a PCR-lemez előkészítése az amplifikáció előtti területen történik, míg a hőmérséklet-szabályozó inkubátorban történő PCR az amplifikáció utáni területen történik. Az amplifikáció utáni lépések a következők: PCR-tisztítás, valamint könyvtár-normalizálás és keverékkészítés.

A lépések között jelezve vannak a biztonságos megszakítási pontok.

1. ábra: A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat könyvtár-előkészítési munkafolyamata



Használati útmutató

A TruSight cisztás fibrózis könyvtár-előkészítési kellékek két vizsgálathoz, a cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálathoz és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálathoz használhatók. A TruSight cisztás fibrózis munkafolyamat a vizsgálat kiválasztásából, a könyvtár-előkészítésből, a szekvenálásból és a futtatás utáni mosásból áll. A vizsgálat kiválasztásának a kivételével az eljárás minden lépése megegyezik a két vizsgálat esetén.

A vizsgálat kiválasztása és a futtatás beállítása

- ▶ A TruSight cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat használata esetén lásd: *A Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 elemzési modul használata, 20. oldal.*
 - ▶ Ugyanebben a részben található a Local Run Manager CF-139 Variant 2.0 Micro elemzési modul használatára vonatkozó utasítások is. Ebben az esetben ügyeljen arra, hogy a futtatás létrehozásakor a **CF 139-Variant 2.0 Micro** lehetőséget válassza ki, ne pedig a CF 139-Variant 2.0 lehetőséget.
- ▶ A TruSight cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat használata esetén lásd: *A Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 elemzési modul használata, 21. oldal.*
 - ▶ Ugyanebben a részben található a Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro elemzési modul használatára vonatkozó utasítások is. Ebben az esetben ügyeljen arra, hogy a futtatás létrehozásakor a **CF Clinical Seq 2.0 Micro** lehetőséget válassza ki, ne pedig a CF Clinical Seq 2.0 lehetőséget.

A Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 elemzési modul használata

Paraméterek beállítása

- 1 Jelentkezzen be a Local Run Managerbe.
- 2 Válassza a **Create Run** (Futtatás létrehozása), majd a **CF 139 variáns 2.0 lehetőséget**.
- 3 Írja be a futtatás nevét, amely azonosítja a futtatást a szekvenálástól az elemzésig. Használjon alfanumerikus karaktereket, szóközőket, aláhúzásokat vagy kötőjeleket (legfeljebb 40 karakter).
- 4 **[Választható]** Adja meg a futtatás leírását. Használjon alfanumerikus karaktereket, szóközőket, aláhúzásokat vagy kötőjeleket (legfeljebb 150 karakter).
- 5 Adja meg a könyvtár-előkészítési készlet tételszámát és lejárat dátumát.

Minták megadása a futtatáshoz

Adja meg a futtatásban szereplő mintákat az alábbi lehetőségek egyikével.

- ▶ **Enter samples manually** (Minták manuális bevitel) – A Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn található üres táblázat használatával. A javasolt mintaüregek ki vannak emelve.
- ▶ **Import samples** (Minták importálása) – Egy külső, vesszővel elválasztott értékek (*.csv) formátumú fájl megkeresésével. Egy sablon letölthető a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn.

Minták manuális bevitel

- 1 Adjon meg egy egyedi mintanevet a Sample Name (Mintanév) mezőben. Használjon alfanumerikus karaktereket, kötőjeleket vagy aláhúzásokat (legfeljebb 40 karakter).
- 2 Pozitív és negatív kontrollminták kiválasztásához kattintson a jobb gombbal. A mentéshez a futtatásnak legalább egy pozitív és egy negatív kontrollt kell tartalmaznia.
- 3 **[Opcionális]** Adja meg a minta leírását a Sample Description (Minta leírása) lapon. Használjon alfanumerikus karaktereket, kötőjeleket vagy aláhúzásokat (legfeljebb 50 karakter).
- 4 **[Opcionális]** Válasszon ki egy Index 1 adaptert az Index 1 (i7) legördülő listából. Ez a lépés opcionális, mivel az i7 és i5 indexkombinációk automatikusan feltöltődnek egy alapértelmezett elrendezéssel.
- 5 **[Opcionális]** Válasszon ki egy Index 2 adaptert az Index 2 (i5) legördülő listából. Ez a lépés opcionális, mivel az i7 és i5 indexkombinációk automatikusan feltöltődnek egy alapértelmezett elrendezéssel.

- 6 Válassza a **Print** (Nyomtatás) ikont a lemezelrendezés megjelenítéséhez.
- 7 Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a könyvtárak elkészítéséhez referenciaként használandó lemezelrendezés kinyomtatásához.
- 8 **[Opcionális]** Válassza az **Export** (Exportálás) lehetőséget a mintainformációs fájl exportálásához.
- 9 Válassza ki a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.
Ha 24-nél kevesebb mintát adott meg, megjelenik az Insufficient Sample (Nem elegendő minta) ablak. A folytatáshoz válassza a **Proceed** (Folytatás) lehetőséget, vagy a minták szerkesztéséhez válassza a **Cancel** (Mégse) lehetőséget.

**FIGYELEM!**

A 24-nél kevesebb mintával történő szekvenálást az Illumina nem validálta.

Minták importálása

A mintainformációk kétféle fájltypusból importálhatók:

- ▶ Mintainformációs fájl, amelyet korábban a CF 139 variáns 2.0 vizsgálati modulból exportáltak az Export (Exportálás) funkcióval.
- ▶ Sablonfájl, amely a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn a **Template** (Sablon) lehetőség kiválasztásával hozható létre. A sablonfájl tartalmazza a megfelelő oszlopcímeket az importáláshoz, helyőrző információkkal az egyes oszlopokban. Használjon külső szerkesztőt a sablonfájl testreszabásához:
 - 1 A futtatásban szereplő összes mintához adja hozzá a mintainformációkat.
 - 2 Ha az összes mintainformáció hozzáadása megtörtént, törölje a nem használt cellákban megmaradt helyőrző információkat.
 - 3 Mentse a sablonfájlt.

Mintainformációk importálása:

- 1 Válassza az **Import Samples** (Minták importálása) lehetőséget, majd keresse meg a fájlt, és válassza ki.
- 2 Válassza a **Print** (Nyomtatás) ikont a lemezelrendezés megjelenítéséhez.
- 3 Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a könyvtárak elkészítéséhez referenciaként használandó lemezelrendezés kinyomtatásához.
- 4 Válassza ki a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.
Ha 24-nél kevesebb mintát adott meg, megjelenik az Insufficient Sample (Nem elegendő minta) ablak. A folytatáshoz válassza a **Proceed** (Folytatás) lehetőséget, vagy a minták szerkesztéséhez válassza a **Cancel** (Mégse) lehetőséget.

**FIGYELEM!**

A 24-nél kevesebb mintával történő szekvenálást az Illumina nem validálta.

Futtatás szerkesztése

A szekvenálás előtt a futtatás adatainak szerkesztésére vonatkozó utasítások az MiSeqDx készüléken futó *Local Run Manager szoftver referencia-útmutatója* (dokumentumszám: 100000011880) című dokumentumban található.

A Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 elemzési modul használata

Paraméterek beállítása

- 1 Jelentkezzen be a Local Run Managerbe.
- 2 Válassza a **Create Run** (Futtatás létrehozása), majd a **CF Clinical Seq 2.0** lehetőséget.
Egy felugró ablak jelenik meg, amely a **CF Clinical Seq 2.0** kiválasztásának megerősítését kéri.

CF CLINICAL SEQ 2.0 FUTTATÁS MEGERŐSÍTÉSE

Biztosan folytatni akarja a CF Clinical Seq 2.0 (cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat) futtatását?

Megjegyzés: Ha meg akarja változtatni a kiválasztott futtatást, nyomja meg a Cancel (Mégse) gombot, és válasszon másikat.

Jelölje be a **CF Clinical Seq 2.0** futtatás megerősítéséhez

Cancel (Mégse) Confirm (Megerősítés)

- 3 Jelölje be a jelölőnégyzetet, és válassza a **Confirm** (Megerősítés) lehetőséget a folytatáshoz (vagy válassza a **Cancel** (Mégse) lehetőséget a főképernyőre való visszatéréshez).
- 4 Írja be a futtatás nevét, amely azonosítja a futtatást a szekvenálástól az elemzésig. Használjon alfanumerikus karaktereket, szóközöket, aláhúzásokat vagy kötőjeleket (legfeljebb 40 karakter).
- 5 **[Választható]** Adja meg a futtatás leírását. Használjon alfanumerikus karaktereket, szóközöket, aláhúzásokat vagy kötőjeleket (legfeljebb 150 karakter).
- 6 Adja meg a könyvtár-előkészítési készlet tételszámát és lejárat dátumát.

Minták megadása a futtatáshoz

Adja meg a futtatásban szereplő mintákat az alábbi lehetőségek egyikével.

- ▶ **Enter samples manually** (Minták manuális beville) – A Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn található üres táblázat használatával. A javasolt mintaüregek ki vannak emelve.
- ▶ **Import samples** (Minták importálása) – Egy külső, vesszővel elválasztott értékek (*.csv) formátumú fájl megkeresésével. Egy sablon letölthető a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn.

Minták manuális beville

- 1 Adjon meg egy egyedi mintanevet a Sample Name (Mintanév) mezőben. Használjon alfanumerikus karaktereket, kötőjeleket vagy aláhúzásokat (legfeljebb 40 karakter).
- 2 Pozitív és negatív kontrollminták kiválasztásához kattintson a jobb gombbal. A mentéshez a futtatásnak legalább egy pozitív és egy negatív kontrollt kell tartalmaznia.
- 3 **[Opcionális]** Adja meg a minta leírását a Sample Description (Minta leírása) lapon. Használjon alfanumerikus karaktereket, kötőjeleket vagy aláhúzásokat (legfeljebb 50 karakter).
- 4 **[Opcionális]** Válasszon ki egy Index 1 adaptert az Index 1 (i7) legördülő listából. Ez a lépés opcionális, mivel az i7 és i5 indexkombinációk automatikusan feltöltődnek egy alapértelmezett elrendezéssel.
- 5 **[Opcionális]** Válasszon ki egy Index 2 adaptert az Index 2 (i5) legördülő listából. Ez a lépés opcionális, mivel az i7 és i5 indexkombinációk automatikusan feltöltődnek egy alapértelmezett elrendezéssel.
- 6 Válassza a **Print** (Nyomtatás) ikont a lemezelrendezés megjelenítéséhez.
- 7 Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a könyvtárak elkészítéséhez referenciaként használandó lemezelrendezés kinyomtatásához.
- 8 **[Opcionális]** Válassza az **Export** (Exportálás) lehetőséget a mintainformációs fájl exportálásához.
- 9 Válassza ki a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget. Ha 24-nél kevesebb mintát adott meg, megjelenik az Insufficient Sample (Nem elegendő minta) ablak. A folytatáshoz válassza a **Proceed** (Folytatás) lehetőséget, vagy a minták szerkesztéséhez válassza a **Cancel** (Mégse) lehetőséget.



FIGYELEM!

A 24-nél kevesebb mintával történő szekvenálást az Illumina nem validálta.

Minták importálása

A mintainformációk kétféle fájltypusból importálhatók:

- ▶ Mintainformációs fájl, amelyet korábban a CF klinikai szekvenálási 2.0 modulból exportáltak az Export (Exportálás) funkcióval.
- ▶ Sablonfájl, amely a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn a **Template** (Sablon) lehetőség kiválasztásával hozható létre. A sablonfájl tartalmazza a megfelelő oszlopcímeket az importáláshoz, helyőrző információkkal az egyes oszlopokban. Használjon külső szerkesztőt a sablonfájl testreszabásához:
 - 1 A futtatásban szereplő összes mintához adja hozzá a mintainformációkat.
 - 2 Ha az összes mintainformáció hozzáadása megtörtént, törölje a nem használt cellákban megmaradt helyőrző információkat.
 - 3 Mentse a sablonfájlt.

Mintainformációk importálása:

- 1 Válassza az **Import Samples** (Minták importálása) lehetőséget, majd keresse meg a fájlt, és válassza ki.
- 2 Válassza a **Print** (Nyomtatás) ikont a lemezrendezés megjelenítéséhez.
- 3 Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a könyvtárak elkészítéséhez referenciaként használandó lemezrendezés kinyomtatásához.
- 4 Válassza ki a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.
Ha 24-nél kevesebb mintát adott meg, megjelenik az Insufficient Sample (Nem elegendő minta) ablak. A folytatáshoz válassza a **Proceed** (Folytatás) lehetőséget, vagy a minták szerkesztéséhez válassza a **Cancel** (Mégse) lehetőséget.



FIGYELEM!

A 24-nél kevesebb mintával történő szekvenálást az Illumina nem validálta.

Futtatás szerkesztése

A szekvenálás előtt a futtatás adatainak szerkesztésére vonatkozó utasítások az MiSeqDx készüléken futó *Local Run Manager szoftver referencia-útmutatója* (dokumentumszám: 1000000011880) című dokumentumban található.

Könyvtár-előkészítés



MEGJEGYZÉS

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat könyvtár-előkészítési munkafolyamata megegyezik.

Az oligonukleotid-keverék hibridizálása

Fogyóeszközök

- ▶ 96 üregű PCR-lemez
- ▶ Genomikus DNS (gDNS) minták
- ▶ Hibridizációs puffer
- ▶ Pozitív kontrollminta
- ▶ Cisztás fibrózis oligonukleotid-keverék
- ▶ TE-puffer
- ▶ Öntapadós alumínium zárófólia

Előkészítés

- 1 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
Hibridizációs puffert	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexelje erősen, hogy minden kicsapódott anyag teljesen feloldódjon, majd a folyadék összegyűjtéséhez röviden centrifugálja a csöveket.
Cisztás fibrózis oligonukleotid-keverék	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexelje erősen, hogy minden kicsapódott anyag teljesen feloldódjon, majd a folyadék összegyűjtéséhez röviden centrifugálja a csöveket.

- 2 Hozza szobahőmérsékletre a gDNS-mintákat és a pozitív kontrollmintát.
- 3 Állítson be egy 96 üregű fűtőblokkot 95 °C-ra.
- 4 Melegítse elő az inkubátort 37 °C-ra.

Eljárás

- 1 Lásjon el egy új 96 üregű PCR-lemezt a HYB felirattal.
- 2 Hozzon létre egy mintalemezt a Local Run Managerben kinyomtatott, a lemezt ábrázoló grafika alapján.
- 3 A Local Run Managerben kinyomtatott lemezelrendezésnek megfelelően adjon 5 µl negatív kontrollt (például TE-puffert) a HYB lemez megfelelő üregébe.
- 4 Adjon 5 µl, 50 ng/µl koncentrációjú mintát vagy kontrollt (tehát összesen 250 ng-ot) a HYB lemez megfelelő üregeibe.
- 5 Adjon 5 µl tisztás fibrózis oligonukleotid-keveréket mindegyik mintaüregbe.
- 6 Adjon 40 µl hibridizációs puffert a HYB lemezen található minden mintához.
- 7 Az összekeveréshez óvatosan pipettázza fel és le 3–5 alkalommal.
- 8 Zárja le a HYB lemezt, és centrifugálja 1000 g sebességgel, 20 °C-on, 1 percig.
- 9 Helyezze a HYB lemezt az előfűtött, 95 °C-os fűtőblokkba, és inkubálja 1 percig.
- 10 Csökkentse a fűtőblokk beállítását 40 °C-ra, és folytassa az inkubációt, amíg el nem éri a 40 °C-ot (körülbelül 80 perc).

A fokozatos lehűlés döntő jelentőségű a megfelelő hibridizációhoz.

BIZTONSÁGOS ABBAHAGYÁSI PONT

Miután a fűtőblokk elérte a 40 °C-ot, a HYB lemez 40 °C-on tartva 2 óráig stabil.

Nem kötött oligonukleotidok eltávolítása

Fogyóeszközök

- ▶ Extenziós-ligációs keverék
- ▶ Szűrőlemez
- ▶ Erőteljes mosópuffer
- ▶ Univerzális mosópuffer
- ▶ MIDI-lemez

Előkészítés

- 1 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
Extenziós-ligációs keverék	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze.
Erőteljes mosópuffer	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Alaposan vortexelje. Győződjön meg arról, hogy minden csapadék feloldódott.
Univerzális mosópuffer	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze.

- 2 Szerelje össze a szűrőlemez-egységet (FPU) a **következőkből, felülről lefelé:**
 - Fedél
 - Szűrőlemez
 - Adapterperem
 - MIDI-lemez
- 3 Végezze el a szűrőlemez membránjának előmosását:
 - a Adjon 45 µl erőteljes mosópuffert minden üregbe.
 - b Fedje le a szűrőlemezt a fedelével, és centrifugálja 2400 g-vel, 20 °C-on, 5 percig.
- 4 Ellenőrizze, hogy a szűrőlemez mindegyik ürege teljesen átereszt-e az oldatot. Ha a mosópuffer nem haladt át teljes mértékben, ismét centrifugálja 2400 g-vel 20 °C-on, amíg az összes folyadék át nem haladt (még 5–10 percig).



FIGYELEM!

Alapvető fontosságú a centrifuga hőmérsékletének szabályozása a mosási lépések során. Ha a hőmérséklet 25 °C-ra vagy magasabbra emelkedik, a magasabb hőmérséklet a primer erősebb kötődését okozhatja. Ritka esetekben, ha a mintában a primerkötő területeken található SNV, az erősebb kötődés allél kieséséhez vezethet.

Eljárás

- 1 Távolítsa el a HYB lemezt a fűtőblokkról, és centrifugálja 1000 g sebességgel, 20 °C-on, 1 percig.
- 2 55 µl-re állított többcsatornás pipettával vigye át mindegyik minta teljes mennyiségét a szűrőlemez megfelelő üregeibe.
- 3 Fedje le a szűrőlemezt a fedelével, és centrifugálja 2400 g-vel, 20 °C-on, 5 percig.
- 4 Végezze el a szűrőlemez mosását:
 - a Adjon 45 µl erőteljes mosópuffert minden mintaüregbe.
 - b Fedje le a szűrőlemezt a fedelével, és centrifugálja 2400 g-vel, 20 °C-on, 5 percig.
- 5 Mossa meg a lemezt **még egyszer**.
- 6 Ha a mosópuffer nem haladt át teljes mértékben, ismét centrifugálja 2400 g-vel 20 °C-on, amíg az összes folyadék át nem haladt (még 5–10 percig).
- 7 Ártalmatlanítsa az átfolyt folyadékot, majd ismét állítsa össze az FPU-t.
- 8 Adjon 45 µl univerzális mosópuffert minden mintaüregbe.
- 9 Fedje le a szűrőlemezt a fedelével, és centrifugálja 2400 g-vel, 20 °C-on, 10 percig.
- 10 A centrifugálás után győződjön meg arról, hogy az összes folyadék áthaladt. Szükség esetén ismétlje meg a centrifugálást.

Kötött oligonukleotidok extenziója és ligációja

Fogyóeszközök

- ▶ Extenziós-ligációs keverék
- ▶ Öntapadós alumínium zárófólia

Eljárás

- 1 Adjon 45 µl extenziós-ligációs keveréket a szűrőlemezen lévő összes mintaüregbe.
- 2 Zárja le a szűrőlemezt, majd fedje le a fedelével.
- 3 Inkubálja az FPU-t 37 °C-ra előmelegített inkubátorban 45 percig.
- 4 Az FPU lemez inkubálása közben készítse elő az AMP (amplifikációs) lemezt a következő szakaszban leírtaknak megfelelően.

PCR-rel végzett amplifikáció

Fogyóeszközök

- ▶ 96 üregű PCR-lemez
- ▶ PCR-lemez-fólia
- ▶ Indexprimerek (A501–A508 és A701–A712)
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ PCR-főkeverék
- ▶ PCR-polimeráz
- ▶ 15 mL-es kúpos cső

Előkészítés

- 1 A Local Run Managerben található lemezelrendezési ábra alapján állapítsa meg a használandó indexprimereket.
- 2 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
Indexprimerek (A501–A508 és A701–A712)	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
PCR-polimeráz	-25 °C és -15 °C között	Hagyja a fagyasztóban, amíg szükség nem lesz rá a PCR-munkaoldat elkészítéséhez.
PCR-főkeverék	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.

- 3 Készítsen friss 0,05 N NaOH-oldatot: adjon 25 µl 10 N NaOH-ot 4975 µl RNáz/DNáz-mentes vízhez.
- 4 Lásson el egy új 96 üregű PCR-lemezt az AMP felirattal.
- 5 Adjon indexprimereket az AMP-lemezhez az alábbiak szerint.
 - a Adjon 4 µl-t a kiválasztott 2. indexprimerekből (A501–A508) az AMP-lemez megfelelő üregébe.
 - b Dobja el az eredeti fehér kupakokat, és helyezzen fel új fehér kupakokat.
 - c Adjon 4 µl-t a kiválasztott 1. indexprimerekből (A701–A712) az AMP-lemez megfelelő sorába.
 - d Dobja el az eredeti narancsszínű kupakokat, és helyezzen fel új narancsszínű kupakokat.
- 6 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
PCR-polimeráz	-25 °C és -15 °C között	Vegye ki a fagyasztóból, és rövid ideig centrifugálja. Azonnal folytassa a következő lépéssel. Ha a PCR-polimerázt további készítményekhez fogják használni, a PCR-munkaoldat elkészítése után tegye vissza a tárolóba.

- 7 Készítse elő a PCR-munkaoldatot a következő módon.



MEGJEGYZÉS

Az alábbi utasítások 96 minta feldolgozásához szükséges térfogatokra vonatkoznak. Ha kevesebb mintát dolgoz fel, a reagens takarékos felhasználása érdekében ennek megfelelően állítsa be a térfogatokat.

- a 96 minta esetén adjon 56 µl PCR-polimerázt 2,8 ml PCR-főkeverékhez.
- b Keverje össze 20-szori átfordítással.

A PCR-munkaodat szobahőmérsékleten 10 percig stabil.

Eljárás

- 1 Vegye ki az FPU-t az inkubátorból, majd távolítsa el a zárófóliát.
- 2 Fedje le a szűrőlemezt a fedelével, és centrifugálja 2400 g-vel, 20 °C-on, 2 percig.
- 3 Adjon 25 µl 0,05 N NaOH-ot a szűrőlemezen minden üregbe.
- 4 Pipettázza fel és le 5–6 alkalommal.
- 5 Fedje le a szűrőlemezt a fedelével és inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
- 6 A szűrőlemez inkubálása közben adjon 22 µl PCR-főkeveréket az AMP-lemez mindegyik, indexprimereket tartalmazó üregébe.
- 7 Vigye át a szűrőből kioldott mintákat az AMP-lemezre a következő módon.
 - a Pipettázza a szűrőlemez első oszlopában található mintákat 5–6 alkalommal fel és le.
 - b Vigyen át 20 µl-t a szűrőlemezről az AMP-lemez megfelelő oszlopába.
 - c A DNS és a PCR-főkeverék összekeveréséhez óvatosan pipettázza fel és le 5–6 alkalommal.
 - d A többi oszlopnál is végezze el szűrőlemezről az AMP-lemezre történő átvitel lépéseit.
- 8 Zárja le az AMP-lemezt, és rögzítse a zárófóliát gumigörgővel.
- 9 Centrifugálja 1000 g-vel, 20 °C-on, 1 percig.
- 10 Vigye át az AMP-lemezt az amplifikáció utáni területre.
- 11 Végezze el a PCR-t a következő programmal egy hőmérséklet-változtató inkubátorban:
 - ▶ 95 °C 3 percig
 - ▶ 25 ciklus a következők szerint:
 - ▶ 95 °C 30 másodpercig
 - ▶ 62 °C 30 másodpercig
 - ▶ 72 °C 60 másodpercig
 - ▶ 72 °C 5 percig
 - ▶ Tárolás 10 °C-on

BIZTONSÁGOS ABBAHAGYÁSI PONT

Ha nem folytatja azonnal a PCR-tisztítással, az AMP-lemez maradhat éjszakára az inkubátorban, vagy 2 °C és 8 °C között tárolható 48 óráig.

PCR-tisztítás

Fogyóeszközök

- ▶ 50 mL-es kúpos cső
- ▶ Egyszer használatos öntapadós lemezfóliák
- ▶ Két MIDI-lemez
- ▶ Elúciós puffer
- ▶ PCR-tisztító gyöngyök

Előkészítés

- 1 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
PCR-tisztító gyöngyök	2 °C és 8 °C között	Hagyja állni 30 percig, hogy szobahőmérsékletre melegedjen.

- 2 96 minta esetén készítsen friss 80%-os EtOH-t 36 ml abszolút EtOH-ból és 9 ml DNáz/RNáz-mentes vízből. Alaposan keverje össze.



MEGJEGYZÉS

Ha 96-nál kevesebb mintát dolgoz fel, a reagensek takarékos felhasználása érdekében ennek megfelelően állítsa be a térfogatokat.

Eljárás

- 1 Centrifugálja az AMP-lemezt 1000 g-vel, 20 °C-on, 1 percig.
- 2 Lásson el egy új MIDI-lemezt a CLP felirattal.
- 3 10-szer fordítsa át a PCR-tisztító gyöngyök edényét. Alaposan vortexelje, majd újra fordítsa át 10-szer. Tekintse meg az oldatot, hogy a gyöngyök reszuszpendálódtak-e.
- 4 Adjon 45 µl PCR-tisztító gyöngyöt a CLP-lemez mindegyik üregébe.
- 5 Vigye át a PCR-termék teljes mennyiségét az AMP-lemez minden egyes üregéből a CLP-lemez megfelelő üregébe.
- 6 Zárja le, és rázza mikrolemezrázóval 1800 rpm-en 2 percig.
- 7 Inkubálja szobahőmérsékleten rázás nélkül 10 percig.
- 8 Helyezze a lemezt a mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (~2 perc).
- 9 Amíg a CLP-lemez a mágneses állványon van, óvatosan távolítsa el és ártalmatlanítsa a felülúszót.
- 10 Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
 - a Tartsa a mágneses állványon, és adjon 200 µl friss 80%-os EtOH-t minden egyes üregbe.
 - b Várjon legalább 30 másodpercig, vagy amíg a felülúszó tiszta nem lesz.
 - c Minden üregből szívja le és öntse ki a felülúszót.
- 11 Mossa meg a gyöngyöket **még egyszer**.
- 12 20 µl-re állított P20 többcsatornás pipettával távolítsa el a felesleges EtOH-t.
- 13 Vegye le a CLP-lemezt a mágneses állványról, és levegőn szárítsa a gyöngyöket 10 percig.
- 14 Adjon mindegyik mintához 30 µl elúciós puffert.
- 15 Zárja le a CLP-lemezt, és rázza mikrolemezrázóval 1800 rpm-en 2 percig. A rázás után ellenőrizze, hogy a minták reszuszpendálódtak-e. Ha nem, ismételje meg ezt a lépést.
- 16 Inkubálja szobahőmérsékleten 2 percig.
- 17 Helyezze a CLP-lemezt a mágneses állványra, és várjon, amíg a felülúszó kitisztul (~2 perc).
- 18 Lásson el egy új MIDI-lemezt az LNP felirattal.
- 19 Vigyen át 20 µl felülúszót a CLP-lemez mindegyik üregéből az LNP-lemez megfelelő üregébe.
- 20 **[Opcionális]** Vigye át a megmaradt 10 µl felülúszót a CLP-lemezből egy új lemezbe, és címkézze fel a lemezt a futtatás nevével és dátumával. Ezt a lemezt tárolja -25 °C és -15 °C között a szekvenálási futtatás és az adatelemzés befejeződéséig. A tisztított PCR-termékek használhatók a hibaelhárításhoz a minta vizsgálatának sikertelensége esetén.

BIZTONSÁGOS ABBAHAGYÁSI PONT

Ha itt abba hagyja, zárja le az LNP-lemezt, és centrifugálja 1000 g-vel, 20 °C-on, 1 percig. A lemez 2 °C és 8 °C között 3 óráig stabil.

Könyvtár-normalizálás és keverékkészítés

Fogyóeszközök

- ▶ 15 ml-es kúpos cső
- ▶ 96 üregű PCR-lemez
- ▶ Mikrocentrifuga-csövek
- ▶ Könyvtárgyöngyök
- ▶ Könyvtárhígítási puffer

- ▶ Könyvtár-normalizálási hígítószer
- ▶ Könyvtár-normalizálási mosószer
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ RN-áz-/DN-áz-mentes víz

Előkészítés

- 1 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
Könyvtárgyöngyök	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.
Könyvtárhígítási puffer	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Alaposan vortexelje. Győződjön meg arról, hogy minden csapadék feloldódott.
Könyvtár-normalizálási hígítószer	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Alaposan vortexelje. Győződjön meg arról, hogy minden csapadék feloldódott.
Könyvtár-normalizálási mosószer	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Alaposan vortexelje.

- 2 Készítsen friss 0,1 N NaOH-oldatot: adjon 50 µl 10 N NaOH-ot 4950 µl RNáz/DNáz-mentes vízhez.

Eljárás

- 1 Keverje össze a könyvtár-normalizálási hígítószerrel és a könyvtárgyöngyöket egy új 15 ml-es kúpos kémcsőben a következő módon:



MEGJEGYZÉS

Az alábbi utasítások 96 minta feldolgozásához szükséges térfogatokra vonatkoznak. Ha kevesebb mintát dolgoz fel, a reagensek takarékos felhasználása érdekében ennek megfelelően állítsa be a térfogatokat.

- a 96 mintához adjon 4,4 ml könyvtár-normalizálási hígítószerrel.
- b Vortexelje erőteljesen a könyvtárgyöngyöket 1 percig, közben többször átfordítva, amíg a gyöngyök nem reszuszpendálódnak, és a cső felfordításakor nem található pellet az alján.
- c A reszuszpendáláshoz pipettázza a könyvtárgyöngyöket 10-szer fel és le.



FIGYELEM!

Különlegesen fontos a cső alján található könyvtárgyöngyök teljes mértékű reszuszpendálása. A P1000 használata biztosítja a gyöngyök homogén reszuszpendálását és azt, hogy ne maradjanak gyöngyök a cső alján. Ez elengedhetetlen fontosságú ahhoz, hogy az áramlási cellában konzisztens klasztersűrűség alakuljon ki.

- d 96 minta esetén pipettázzon 800 µl könyvtárgyöngyöt a könyvtár-normalizálási oldószert tartalmazó kúpos csőbe.
- e Az összekeveréshez fordítsa át a csövet 15–20-szor.
- 2 Adjon az LNP-lemez mindegyik üregébe 45 µl könyvtár-normalizálási oldószert és a könyvtárgyöngyöket tartalmazó munkaoldatot.
- 3 Zárja le és rázza mikrolemezrázóval 1800 rpm-en 30 percig.



MEGJEGYZÉS

Ha ugyanazon a napon folytatja a szekvenálással, kezdje el a reagenskazetta felolvasztását. Az MiSeqDx reagenskazetta felolvasztására vonatkozó utasítások lásd: *Előkészítés a könyvtár-szekvenáláshoz, 31. oldal.*

- 4 Helyezze az LNP-lemezt a mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (~2 perc).

- 5 Amíg az LNP-lemez a mágneses állványon van, óvatosan távolítsa el és ártalmatlanítsa a felülűszót.
- 6 Vegye le az LNP-lemezt a mágneses állványról, és mossa meg a gyöngyöket a könyvtár-normalizálási mosószerrel a következő módon:
 - a Adjon minden üregbe 45 µl könyvtár-normalizálási mosószert.
 - b Zárja le a LNP-lemezt, és rázza mikrolemezrázóval 1800 rpm-en 5 percig.
 - c Helyezze a lemezt a mágneses állványra legalább 2 percig, vagy amíg a felülűszó tiszta nem lesz.
 - d Óvatosan szívja le és ártalmatlanítsa a felülűszót.
- 7 Ismétlje meg a előző lépésben leírt könyvtár-normalizálási mosási eljárást.
- 8 20 µl-re állított P20 többcsatornás pipettával szívja le a felesleges könyvtár-normalizálási mosófolyadékot.
- 9 Vegye le az LNP-lemezt a mágneses állványról, majd minden üregbe adjon 30 µl 0,1 N NaOH-ot.
- 10 Zárja le a LNP-lemezt, és rázza mikrolemezrázóval 1800 rpm-en 5 percig.
- 11 Az 5 perces elúció közben lásson el egy új 96 üregű PCR-lemezt az SGP felirattal.
- 12 Adjon 30 µl könyvtártárolási puffert mindegyik üregbe.
- 13 Győződjön meg arról, hogy az LNP-lemezben található mindegyik minta teljesen reszuszpendálódott. Ha a minták nincsenek teljesen reszuszpendálva, óvatosan pipettázza fel és le a minták tartalmát, vagy ütögesse a lemezt az asztalhoz, majd rázza még 5 percig.
- 14 Helyezze az LNP-lemezt legalább 2 percre a mágneses állványra.
- 15 Egy 30 µl-re beállított többcsatornás pipettával vigye át a felülűszót az LNP-lemezből az SGP-lemezbe. Az összekeveréshez óvatosan pipettázza fel és le 5 alkalommal.
- 16 Zárja le az SGP-lemezt, és centrifugálja 1000 g-vel, 20 °C-on, 1 percig.
- 17 Vortexelje a könyvtárhígítási puffert, és ellenőrizze, hogy minden csapadék feloldódott-e. A tartalom összegyűjtéséhez röviden centrifugálja.
- 18 Lásson el egy új mikrocentrifuga-csővet a PAL felirattal.
- 19 Azonosítsa a szekvenáláshoz összekeverendő mintákat. Összesen 96 minta keverhető össze szekvenáláshoz.
- 20 Vigyen át 5 µl-t minden szekvenálni kívánt könyvtárból az SGP-lemez mindegyik üregéből oszloponként egy nyolccsöves PCR-csősor megfelelő csövébe.
- 21 Vigye át a nyolccsöves PCR-csősor tartalmát a PAL-csőbe. Vortexelje a PAL-csővet, amíg teljesen össze nem keveredik.
- 22 Zárja le az SGP-lemezt öntapadós lemezfóliával, és írja rá a futtatás nevét és dátumát.



MEGJEGYZÉS

Az SGP-lemez -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 3 napig tárolható, és szükség esetén felhasználható az összekeverés megismétléséhez.

- 23 Lásson el 2–3 új mikrocentrifuga-csővet a DAL felirattal.
- 24 Adjon 585 µl könyvtárhígítási puffert a DAL-csővekbe.
- 25 Vigyen át 9 µl PAL-t mindegyik, könyvtárhígítási puffert tartalmazó DAL-csőbe.
- 26 Pipettázza fel és le 3–5 alkalommal, hogy leöblítse a pipettahegyben maradt anyagot, és a teljes mennyiség átvitelre kerüljön.

BIZTONSÁGOS ABBAHAGYÁSI PONT

Ha nem folytatja azonnal az MiSeqDx készüléken végzett szekvenálással, a DAL-csővek 25 °C és 15 °C között tárolhatók 28 napig.

Könyvtárak szekvenálása



MEGJEGYZÉS

A tisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a tisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat könyvtár-szekvenálási munkafolyamata megegyezik.

Előkészítés a könyvtár-szekvenáláshoz

Fogyóeszközök

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3 vagy MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro
- ▶ Könyvtárhígítási puffer
- ▶ PhiX belső kontrollkönyvtár

Előkészítés

- 1 Állítson be egy 1,5 ml-es centrifugacsövekhez való fűtőblokkot 96 °C-ra.
- 2 Jégvödörben készítsen jeges vizes fürdőt.
- 3 Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Reagens	Tárolás	Utasítások
Könyvtárhígítási puffer	-25 °C és -15 °C között	Olvassa fel szobahőmérsékleten. Vortexeléssel keverje össze. Győződjön meg arról, hogy minden csapadék feloldódott. Rövid ideig centrifugálja, és helyezze jeges vízfürdőbe. Az MiSeqDx reagenskészlet v3 szükség esetén további könyvtárhígítási puffert tartalmaz.
PhiX belső kontroll	-25 °C és -15 °C között	Olvassa fel szobahőmérsékleten. Helyezze jeges vízfürdőbe.
MiSeqDx reagenskészlet v3 kazetta	-25 °C és -15 °C között	Hagyja a reagenskazettát felolvadni a szoba-hőmérsékletű vízben körülbelül 90 percig vagy amíg teljesen fel nem olvadt. A reagenskazetta előkészítésére vonatkozó további információkat lásd: MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v2-höz (dokumentumszám: 1000000021961).
MiSeqDx áramlási cella	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Az áramlási cella előkészítésére vonatkozó további információkat lásd: MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v2-höz (dokumentumszám: 1000000021961).
MiSeqDx SBS oldat (PR2)	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Az SBS-oldat előkészítésére vonatkozó további információkat lásd: MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v2-höz (dokumentumszám: 1000000021961).

A PhiX belső kontroll denaturálása és hígítása

Fogyóeszközök

- ▶ Deoxiribonukleáztól/ribonukleáztól mentes víz
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ Könyvtárhígítási puffer
- ▶ PhiX belső kontrollkönyvtár
- ▶ TE-puffer
- ▶ 15 mL-es kúpos cső
- ▶ Mikrocentrifuga-csövek

Előkészítés

- 1 0,1 N NaOH elkészítéséhez egy kúpos csőben keverje össze az alábbiakat:
 - ▶ DNáz-/RNáz-mentes víz (2475 µl)
 - ▶ 10 N NaOH törzsoldat (25 µl)
- 2 Keverje össze a kémcső több alkalommal történő átfordításával.

**FIGYELEM!**

A frissen hígított NaOH használata alapvető fontosságú a minták teljes mértékű denaturálásához az MiSeqDx készüléken történő klasztergeneráláshoz.

Ha a PhiX készítése ugyanazon a napon történik, mint a könyvtár-normalizálás, mindkettőhöz használható ugyanaz a 0,1 N NaOH-készlet.

- 3 Hígítsa a PhiX belső kontroll könyvtárat 2 nM-ra a következők összekeverésével:
 - ▶ 10 nM PhiX belső kontrollkönyvtár (2 µl)
 - ▶ 1-szeres TE-puffer (8 µl)
- 4 Az 1 nM PhiX belső kontrollkönyvtár elkészítéséhez keverje össze a következőket:
 - ▶ 2 nM PhiX belső kontrollkönyvtár (10 µl)
 - ▶ 0,1 N NaOH (10 µl)
- 5 Rövid vortexeléssel keverje össze.
- 6 Centrifugálja az 1 nM PhiX belső kontrollt 280 g sebességgel, 20 °C-on 1 percig.
- 7 Inkubálja a PhiX belső kontrollkönyvtárat 5 percig, szobahőmérsékleten, hogy egyes szálakká denaturálódjon.
- 8 A 20 pM PhiX belső kontrollkönyvtár elkészítéséhez keverje össze a következőket egy új mikrocentrifuga-csőben:
 - ▶ Denaturált PhiX belső kontrollkönyvtár (2 µl)
 - ▶ Előhűtött könyvtárhígítási puffer (98 µl)

**FIGYELEM!**

A denaturált 20 pM PhiX belső kontroll könyvtár egyszeri használatra szolgáló adagokra kiosztva 3 hétig tárolható -25°C és -15°C között.

Minták előkészítése a szekvenáláshoz

- 1 Készüljön elő egy DAL-cső szekvenálására.
- 2 Ha a DAL-csövet fagyasztva tárolták, olvassa fel teljesen, és pipettázza fel és le, hogy összekeveredjen.
- 3 Ha van fagyasztva 20 pM PhiX belső kontroll, vegyen ki egy használatra elegendő részt, olvassa fel teljesen, vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
- 4 Adjon 6 µl 20 pM PhiX belső kontrollt a DAL-csőbe.
- 5 Pipettázza fel és le 3–5 alkalommal, hogy leöblítse a pipettahegyben maradt anyagot, és a teljes mennyiség átvitelre kerüljön.
- 6 Keverje össze a DAL-cső tartalmát maximális sebességgel végzett vortexeléssel.
- 7 Centrifugálja a DAL-csövet 1000 g-vel, 20 °C-on, 1 percig.
- 8 Inkubálja a DAL-csövet fűtőblokkon, 96 °C-on, 2 percig.
- 9 Az inkubálás után a DAL-cső összekeveréséhez fordítsa át 1–2 alkalommal, majd azonnal helyezze jeges vizes fürdőbe.
- 10 Hagyja a DAL-csövet (az összekevert könyvtárat) a jeges vizes fürdőben 5 percig.

Az összekevert könyvtárak betöltése a kazettába

- 1 Egy új 1 ml-es pipettahegygel lyukassza át a reagenskazetta Load Samples (Minták betöltése) feliratú tartálya feletti zárófoliát.
- 2 Pipetázzon 600 µl-t a DAL-csőből a Load Samples (Minták betöltése) feliratú tartályba. Ne érjen hozzá a zárófoliához.
- 3 A minta betöltése után ellenőrizze, hogy nincsenek-e légbuborékok a tartályban. Ha légbuborékok vannak jelen, óvatosan ütögesse a kazettát az asztalhoz, hogy a buborékok távozzanak.
- 4 Az MiSeq kezelőszoftver (MOS) felületén lépjen közvetlenül a futtatás beállítási lépéseire. Az MiSeqDx készüléken végzendő futtatás beállítására vonatkozó további információkat lásd: *MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v2-höz (dokumentumszám: 100000021961)*.

Futtatás utáni mosás a sablonvezeték mosásával

A szekvenálás után határozottan javasolt a sablonvezeték mosását magában foglaló futtatás utáni mosást végezni.



FIGYELEM!

Ha nem végzik el a sablonvezeték mosását, a következő futtatás alkalmával romolhat a negatív kontroll azonosítási aránya.



MEGJEGYZÉS

A futtatás utáni mosási munkafolyamat megegyezik a tisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat és a tisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat esetében.

Fogyóeszközök

- ▶ Mikrocentrifuga-csővek
- ▶ Laboratóriumi minőségű víz
- ▶ Tween 20
- ▶ 5%-os nátrium-hipoklorit
- ▶ MiSeq cső



VIGYÁZAT!

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

Előkészítés

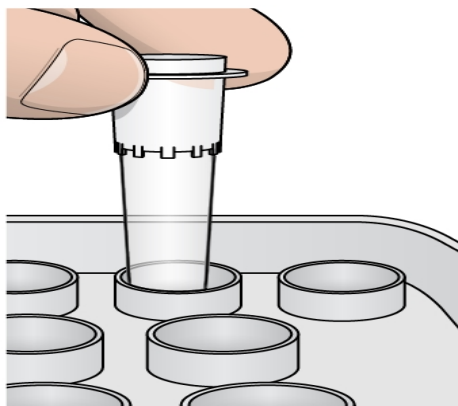
- 1 Készítsen friss mosóoldatot Tween 20-ból és laboratóriumi minőségű vízből az alábbiak szerint.
 - a Adjon 5 ml 100%-os Tween 20 oldatot 45 ml laboratóriumi minőségű vízhez. Ezzel 10%-os Tween 20 oldatot kap.
 - b Adjon 25 ml 10%-os Tween 20 oldatot 475 ml laboratóriumi minőségű vízhez. Ezzel 0,5%-os Tween 20 mosóoldatot kap.
 - c Keverje össze ötszöri átfordítással.
- 2 Készítsen friss mosóoldatot nátrium-hipoklorit-tartalmú mosóoldatból és laboratóriumi minőségű vízből az alábbiak szerint.
 - a Adjon 36 µl 5%-os nátrium-hipoklorit-oldatot 864 µl laboratóriumi minőségű vízhez. Ez a nátrium-hipoklorit-oldat 25-szörös hígítását jelenti.
 - b Adjon 50 µl 1:25 arányban hígított nátrium-hipokloritot 950 µl laboratóriumi minőségű vízhez egy MiSeq csőben.
- 3 Fontos a nátrium-hipoklorit megfelelő koncentrációjának használata. Ellenőrizze a nátrium-hipoklorit százalékos arányát a termék címkéjén. Ha túl magas koncentrációban alkalmazza, ez megakadályozhatja a klasztergenerálást a későbbi futtatások során. Ha 5%-os nátrium-hipoklorit-oldat nem áll rendelkezésre, készítsen 1 ml 0,01%-os nátrium-hipoklorit-oldatot laboratóriumi minőségű vízzel. Ne használjon nátrium-hipoklorit-oldatot karbantartási mosás vagy készenléti mosás alkalmával.
- 4 Készítse el a mosáshoz való oldatokat friss mosóoldattal az alábbiak szerint:

- a Töltsön 6 ml mosóoldatot a mosótálca mindegyik tartályába.
- b Töltsön 350 ml mosóoldatot az 500 ml-es mosópufferes palackba.

Eljárás

- 1 Helyezze a 0,01% nátrium-hipokloritot tartalmazó mosóoldatot tartalmazó MiSeq csövet a mosótálca 17. pozíciójába, amíg a cső nyaka a tálcával egy szintbe nem kerül.
A cső a 17. pozícióban a Tween 20 és laboratóriumi minőségű víz keverékéből készített mosóoldatot helyettesíti.

2. ábra: MiSeq cső a mosótálca 17. pozíciójában



FIGYELEM!

Ügyeljen arra, hogy a nátrium-hipokloritot tartalmazó MiSeq csövet csak a tálca 17-es pozíciójába helyezze be. Ha a csövet más pozícióban helyezi be, a későbbi futtatások során meghiúsulhat a klasztergenerálás.

- 2 Ha a futtatás befejeződött, válassza a **Start Wash** (Mosás indítása) lehetőséget.
A szoftver automatikusan felemeli a szívócsöveket a reagenshűtőben.
- 3 Válassza a Post-Run Wash (Futtatás utáni mosás) képernyőn a **Perform optional template line wash** (Opcionális sablonvezeték-mosás végrehajtása) lehetőséget.
- 4 Nyissa ki a reagensrekesz ajtaját és a reagenshűtő ajtaját, majd húzza ki a használt reagenskazettát a reagenshűtőből.
- 5 Csúsztassa a mosótálcát a reagenshűtőbe ütközésig, és zárja be a reagenshűtő ajtaját.
- 6 Emelje fel a szívócsövek fogantyúját, amely az MiSeqDx SBS-oldatos és a hulladékgyűjtő palack előtt helyezkedik el, amíg az a helyére nem reteszeli.
- 7 Vegye ki az MiSeqDx SBS-oldat palackját, és helyezze be a helyére a mosópufferes palackot.
- 8 Vegye ki a hulladéktartályt, és megfelelően ártalmatlanítsa a tartalmát. Tegye vissza a hulladéktartályt a reagensrekeszbe.
- 9 Lassan engedje le a szívócsövek fogantyúját. Ügyeljen arra, hogy a szívócsövek a mosópufferes palackba és a hulladékgyűjtő palackba süllyedjenek.
- 10 Zárja be a reagensrekesz ajtaját.
- 11 Válassza a **Next** (Tovább) lehetőséget. Elkezdődik a futtatás utáni mosás.
- 12 Ha a mosás befejeződött, hagyja a használt áramlási cellát, a mosótálcát és a maradék mosópufferes palackot a készülékben.
- 13 A szívócsövek a lenti helyzetben maradnak, ez normális. Hagyja a fel nem használt mosóoldatot a mosótálcában és a mosópufferes palackban, hogy megakadályozza a szívócsövek kiszáradását és a levegő bejutását a rendszerbe.

Szekvenált könyvtárak ismételt elemzése

Egy szekvenálási futtatás után ugyanannak a szekvenálási adatkészletnek az ismételt elemzése elvégezhető az *MiSeqDx készüléken futó Local Run Manager szoftver referencia-útmutatója* (dokumentumszám: 100000011880) című dokumentumban található *Elemzés újraütemezése* eljárással. Az elemzés újraütemezése kizárólag azzal a szoftvermodullal végezhető el, amellyel eredetileg végezték a szekvenálást. Az újraütemezett elemzés alkalmazásával szerkeszthetők a minták adatai, és új jelentések készíthetők.



MEGJEGYZÉS

A szekvenáláshoz használt könyvtárkeverékeknek 24–96 mintát kell tartalmazniuk. Ha csak a minták egyik része esetében szükséges az újabb jelentés, az újraütemezett vizsgálat beállításakor kevesebb mintát kell beírni. Csak az újraütemezett vizsgálat beállításakor megadott mintákhoz készül jelentés.

Összekevert könyvtárak ismételt vizsgálatának lehetőségei

A TruSight cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálatához ugyanaz a könyvtár-előkészítési munkafolyamat és ugyanazok a reagensek használatosak, mint a TruSight cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálatához. A könyvtár-előkészítési eljárás megkezdése előtt ki kell választani egy vizsgálatot. Azokban az esetekben azonban, amikor az összekevert könyvtárak (DAL-csővek) további vizsgálatot igényelnek (pl. egy szekvenálási futtatás megismétlése vagy reflexvizsgálat egy másik TruSight CF vizsgálattal), a DAL-csővek szükség szerint használhatók a könyvtár-előkészítés megismétlése nélkül. A vizsgálat ismételt elvégzéséhez kövesse az alábbi eljárást:



MEGJEGYZÉS

A szekvenáláshoz használt könyvtárkeverékeknek legalább 24–96 mintát kell tartalmazniuk. Ha csak a minták egyik része esetében szükséges az újabb jelentés, az szekvenálási futtatás beállításakor kevesebb mintát kell beírni. Minden összekevert minta szekvenálásra kerül, de jelentés csak a szekvenálási futtatás beállítása során megadott mintákról készül.

- 1 Állítsa be a futtatást *A vizsgálat kiválasztása és a futtatás beállítása*, 20. oldal rész utasításainak megfelelően.
- 2 Végezze el a könyvtárak szekvenálását a *Könyvtárak szekvenálása*, 30. oldal rész utasításainak megfelelően.
- 3 A szekvenálási futtatás befejezése után mossa ki az MiSeqDx készüléket a *Futtatás utáni mosás a sablonvezeték mosásával*, 33. oldal rész utasításainak megfelelően.

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat eredményeinek értelmezése

- ▶ A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat 139 CFTR-variáns kimutatására készült, beleértve az ACMG által javasoltakat is (2. táblázat).
- ▶ A vizsgálati jelentés felsorolja a minták nevét és a mintában kimutatott variánssra vonatkozó genotípust.
 - ▶ Minden mintában lekérdezésre kerül a 134 CF-et okozó variáns és az ACMG által ajánlott R117H variáns. A vizsgálati jelentésben csak a kimutatott mutáns allélok szerepelnek.
 - ▶ A PolyTG/PolyT variáns csak akkor szerepel a jelentésben, ha az R117H variáns jelen van. Az R117H variánssal rendelkező betegek esetében további vizsgálatokat kell végezni annak megállapítására, hogy a klinikai fenotípust befolyásoló PolyTG/PolyT variáns (pl. 12-13(TG) vagy 5T) cisz vagy transz helyzetben van-e az R117H variánshoz képest.



MEGJEGYZÉS

A PolyTG/PolyT genotípus meghatározása a cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat segítségével történik, a leggyakoribb genotípusok leolvasásának számlálása alapján. Az új generációs szekvenálás digitális jellegének köszönhetően a vizsgálat számos megfigyelés alapján nagy pontosságot ér el, szemben más, szekvenáláson alapuló technológiákkal, amelyeknél csak néhány megfigyelés történik.

- ▶ Ha egy minta homozigóta F508del vagy I507del genotípussal rendelkezik, és a három jóindulatú polimorfizmus – I506V, I507V és F508C – közül egy vagy több kimutatható, akkor ez a minta esetében jelentésre kerül. Ha mindhárom jóindulatú polimorfizmus vad típusú, a jelentésben az szerepel, hogy a mintában nincsenek jelen az I506V, I507V és F508C variánsai.



MEGJEGYZÉS

Mivel szekvenálással történik a vizsgálat, az F508del vagy I507del jelentését nem befolyásolja a három jóindulatú polimorfizmus jelenléte. Ezért nem történik a kimutatott eredmény korrekciója.

- ▶ Ha egy mintát heterozigótaként azonosít a rendszer, és mind a vad típusú, mind a mutáns allél kimutatható, az eredményben genotípusként HET szerepel.
- ▶ Ha egy mintát homozigótaként azonosít a rendszer, és csak a mutáns allél mutatható ki, az eredményben genotípusként HOM szerepel.
- ▶ Ha egy mintában nem azonosítható variáns, a jelentésben az szerepel, hogy Nem mutatható ki a panel részét képező variáns.
- ▶ A vizsgálati jelentés minden mintához megadja a mintaazonosítási arányt. Az azonosítási arány számításához a rendszer az előre meghatározott megbízhatósági határértéknek megfelelő variánspozíciók számát elosztja az összes lekérdezett pozíció számával.
 - ▶ A feltételes jelentést igénylő minták esetében a rendszer a többi lekérdezett variánst is figyelembe veszi az azonosítási arány számításához.
 - ▶ Azok a variánsok, amelyek megbízhatósági értéke az előre meghatározott határérték alatt van, No call (Nincs azonosítás) eredményként szerepelnek a jelentésben. Ilyenkor ajánlott a minta vizsgálatának megismétlése.
- ▶ A minta eredményét a rendszer csak akkor tekinti érvényesnek, ha az azonosítási arány $\geq 99\%$. Ha az azonosítási arány $< 99\%$, a vizsgálat eredménye Fail (Sikertelen) lesz, és a minta vizsgálatát meg kell ismételni.



MEGJEGYZÉS:

Ha az azonosítási arány $< 50\%$, a vizsgálat eredménye Fail (Sikertelen) lesz, és a jelentésben megjelenik a Sample Failed (Minta vizsgálata sikertelen) megjegyzés. Ilyenkor nem szerepelnek variánsokra vonatkozó adatok. A minta vizsgálatát meg kell ismételni.

- ▶ Ajánlott a felhasználónak a szintetikus mintákkal validált variánsokat (lásd a Pontossági táblázatot) validált referencia-módszerrel ellenőrizni, mielőtt az első alkalommal e variánst tartalmazó jelentést készítené.
- ▶ Ha egy mintában kettőnél több variáns azonosítása történik, ajánlott, hogy a felhasználó ellenőrizze az eredményt a TruSight cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat ismételt elvégzésével friss gDNS-kivonattal, hogy kizárható legyen a minta keresztkontaminációja.



MEGJEGYZÉS

Kettőnél több variáns kimutatása esetén megfontolandó a haplotípus-fázisítás lehetősége.

- ▶ A variánsok bármilyen klinikai értelmezését szakvizsgálóval rendelkező klinikai molekuláris genetikusnak vagy ezzel egyenértékű képesítésű szakembernek kell végeznie a helyi eljárások és irányelvek szerint.¹⁵ A lehetséges értelmezési referenciák többek között a CFTR2 adatbázis,¹¹ Sosnay közleménye,¹³ az ACMG 2004-es irányelvei¹ és az ACOG bizottság 2011-es állásfoglalása.² Az eredmények kiszámításának és bemutatásának módjára vonatkozó információkért, illetve a szöveges fájl formátumú jelentés tartalmának leírásáért tekintse meg az MiSeqDx készülékre telepített elemzőszoftver dokumentációját. A Local Run Managerrel kapcsolatban lásd *Az MiSeqDx készüléken futó Local Run Manager szoftver referencia-útmutatóját (dokumentumszám: 100000011880)* és a *Local Run Manager CF 139 variáns 2.0 elemzési modul munkafolyamati útmutatóját (dokumentumszám: 1000000100945)*.

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat eredményeinek értelmezése

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat arra szolgál, hogy szekvenálja a CFTR gén minden fehérjét kódoló területét (27 exon), az exonokkal szomszédos 5–30 bázispárnyi intronszekvenciákat, a kódoló terület 5' és 3' végével szomszédos körülbelül 100 nukleotidnyi, translációra nem kerülő terület szekvenciáját, valamint két, mélyen egy intronban elhelyezkedő mutációt (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T). A szekvenált területek pontos ismertetése a [3. táblázat](#) található. Ezen kívül a vizsgálat kimutatja a PolyTG/PolyT variánst és két nagy kiterjedésű deléciót (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

- ▶ A vizsgálati jelentés felsorolja a minták nevét és a mintában kimutatott variánssra vonatkozó genotípust.
 - ▶ Minden variáns esetében megadja a genomikus koordinátát, a Human Genome Variation Society (HGVS) által ajánlott cDNS nevét és a fehérje nevét (ha van).
 - ▶ A variáns típusának azonosítása: egynukleotid-variáns (SNV), deléciós/inzerció variáns (DIV), PolyTG/PolyT variáns (PolyTG/PolyT) vagy nagy deléció (DEL).
 - ▶ A genotípus (heterozigóta vagy homozigóta) megállapítható a „referencia”, vagyis az adott genomikus koordináta referencia-bázisszekvenciája és az „eredmény”, vagyis a mintában az adott genomikus pozíciójában található két allél szekvenciája alapján. Például, ha a referencia „G” és az eredmény „A/G”, ez azt jelenti, hogy az illető genomikus koordinátán G>A változás történt, és a genotípus heterozigóta a variáns allél tekintetében. Hasonlóan, ha a referencia „G” és az eredmény „T/T”, ez azt jelenti, hogy az illető genomikus koordinátán G>T változás történt, és a genotípus homozigóta a variáns allél tekintetében.
 - ▶ A variáns pozíciójában lévő szekvenálási mélység a „Depth” (Mélység) mezőben, az allélfrekvencia pedig a „Frequency” (Gyakoriság) szakaszban található.
- ▶ A vizsgálati jelentés minden mintához megadja a mintaazonosítási arányt. Az azonosítási arány számításához a rendszer az előre meghatározott megbízhatósági határértéknek megfelelő variánspozíciók számát elosztja az összes lekérdezett pozíció számával.
 - ▶ Minden olyan pozíció vagy régió genomikus koordinátája, amelyre vonatkozóan a megbízhatósági érték a határérték alatt van, külön szerepel a „Nem azonosított koordináták” szakaszban. A felhasználóknak össze kell hasonlítaniuk a nem azonosított pozíciókat a megfelelő variánsok adataival, hogy azonosítsák az esetlegesen kihagyott variánsokat és ezek populációs gyakoriságát annak meghatározásához, hogy szükséges-e a minta vizsgálatának megismétlése.
- ▶ A minta eredményét a rendszer csak akkor tekinti érvényesnek, ha az azonosítási arány $\geq 99\%$. Ha az azonosítási arány 99% alatti, a vizsgálat eredménye Fail (Sikertelen) lesz, és a minta vizsgálatát meg kell ismételni.
- ▶ Ajánlott a felhasználónak a pontossági vizsgálatban validált variánsoktól (lásd: [Pontosság, 59. oldal](#)) eltérő variánsokat ellenőriznie egy hitelesített referencia-módszerrel, mielőtt az első alkalommal e variánst tartalmazó jelentést készítené.



MEGJEGYZÉS

Kettőnél több variáns kimutatása esetén megfontolandó a haplotípus-fázishatás lehetősége.

- ▶ A variánsok bármilyen értelmezését szakvizsgálóval rendelkező klinikai molekuláris genetikusnak vagy ezzel egyenértékű képesítésű szakembernek kell végeznie a helyi eljárások és irányelvek szerint¹⁵. A lehetséges értelmezési referenciák többek között a CFTR2 adatbázis^{11,12}, Sosnay közleménye¹³, az ACMG 2004-es irányelvei¹ és az ACOG bizottság 2011-es állásfoglalása².

Az eredmények kiszámításának és bemutatásának módjára vonatkozó információkért, illetve a szöveges fájl formátumú jelentés tartalmának leírásáért tekintse meg az MiSeqDx készülékre telepített elemzőszoftver dokumentációját. A Local Run Managerrel kapcsolatban lásd *Az MiSeqDx készüléken futó Local Run Manager szoftver referencia-útmutatóját (dokumentumszám: 100000011880)* és a *Local Run Manager CF klinikai szekvenálási 2.0 elemzési modul munkafolyamati útmutatóját (dokumentumszám: 1000000100946)*.

- ▶ A genetikus a Local Run Manager szoftverben egy legördülő menü segítségével megadja az értelmezési értéket a mintában jelentett mindegyik variánshoz. Az értelmezés választási lehetőségei: CF-causing (CF-et okozó), Mutation of varying clinical consequence (Változó klinikai következményekkel járó mutáció), Mutation of unknown significance (Ismeretlen jelentőségű mutáció), illetve Non-CF causing (CF-et nem okozó). A megadott értéket a rendszer az eredményfájllhoz csatolja, és a Klinikai szekvenálási vizsgálati jelentés értelmezési oszlopában jeleníti meg.

Minőség-ellenőrzési eljárások

A helyes laboratóriumi gyakorlat előírja, hogy kontrollanyagokat kell használni a felhasználó laboratóriumában alkalmazott vérfeldolgozási és technikai eljárásokban mutatkozó olyan különbségek kimutatására, amelyek az eredmények jelentős eltéréseit okozhatják.

- **Negatív kontroll (NTC = nincs kontrollminta-sablon)** – A negatív kontroll használata minden futtatás esetén szükséges az esetleges szennyeződések kimutatására. A negatív kontroll esetében az azonosítási aránynak 10% alatt kell lennie. Ha egy negatív kontroll > 10%-os azonosítási arányt eredményez, és az előző futtatáshoz a sablonvezeték mosását végezték, akkor a vizsgálat feldolgozása során szennyeződés történhetett. A vizsgálat sikertelennek minősül, és a teljes vizsgálatot meg kell ismételni, a könyvtár-előkészítéstől kezdve. A negatív kontroll eredménye Pass (Siker), ha az azonosítási arány \leq 10%, illetve Fail (Sikertelen), ha az azonosítási arány > 10%.



MEGJEGYZÉS

Különösen fontos minden egyes szekvenálási futtatás után elvégezni a sablonvezeték mosását, hogy ne növekedjen a negatív kontroll azonosítási aránya. Ha a negatív kontroll esetén az azonosítási arány > 10%, és az előző futtatás során nem végeztek sablonvezeték-mosást, ajánlott a futtatás utáni sablonvezeték-mosás elvégzése és a szekvenálási futtatás megismétlése.

- **Pozitív kontroll** – Pozitív DNS-kontrollminta szükséges minden futtatáshoz. A pozitív kontrollként szolgáló DNS-mintának egy jól jellemzett, a CFTR legalább egy ismert variánsát tartalmazó mintának kell lennie.¹⁶ Az Illumina a felváltva alkalmazott pozitív kontrollokat ajánlja az ACMG 2008-as CF-mutációk vizsgálatára vonatkozó technikai szabványok és iránymutatások¹⁷, valamint az ACMG 2013-as új generációs szekvenálásra vonatkozó klinikai laboratóriumi szabványok kiadványainak megfelelően.¹⁸ A pozitív kontrollminta eredményének a várt genotípusnak kell lennie. Ha a pozitív kontroll eredménye a várttól eltérő genotípus, akkor lehetséges, hogy hiba történt a mintakövetés vagy az indexprimerek rögzítése során. A teljes vizsgálatot meg kell ismételni, a könyvtár-előkészítéstől kezdve. A pozitív kontroll eredménye Pass (Siker), ha az azonosítási arány \geq 99%, illetve Fail (Sikertelen), ha az azonosítási arány < 99%.
- **Vad típusú kontroll** – Minden futtatás alkalmával ajánlott vad típusú DNS-t tartalmazó kontrollminta vizsgálata. A vad típusú kontrollmintának olyan jól jellemzett mintának kell lennie, amely nem tartalmaz CFTR-variánsokat. A vad típusú kontrollminta eredményének a várt genotípusnak kell lennie. Ha a vad típusú kontroll eredménye a várttól eltérő genotípus, akkor lehetséges, hogy hiba történt a mintakövetés vagy az indexprimerek rögzítése során. A teljes vizsgálatot meg kell ismételni, a könyvtár-előkészítéstől kezdve.
- A minta eredményét a rendszer csak akkor tekinti érvényesnek, ha az azonosítási arány \geq 99%. Ha az azonosítási arány 99% alatti, a vizsgálat eredménye Fail (Sikertelen) lesz, és a minta vizsgálatát meg kell ismételni.
- Mielőtt a felhasználó laboratóriumában először használná ezt a terméket, a vizsgálat teljesítményét ellenőrizni kell több, ismert teljesítményjellemzővel rendelkező pozitív és negatív minta vizsgálatával.
- Minden minőség-ellenőrzési műveletet a helyi és/vagy országos előírásokkal vagy akkreditációs követelményekkel összhangban kell végrehajtani.

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat teljesítményjellemzői

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat teljesítményjellemzői az MiSeqDx cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat teljesítményét értékelő vizsgálatokon alapulnak. A TruSight és az MiSeqDx vizsgálatok egyenértékűségéről lásd: [A teljesítmény egyenértékűsége az Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálatával, 57. oldal.](#)

Pontosság

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat pontosságát négy különböző forrásból származó, a CFTR-variánsok széles skáláját képviselő 500 minta értékelésével vizsgálták. A pontossági adatok elsődleges forrása egy 366 mintából álló panellel végzett klinikai pontossági vizsgálat volt. A minták többsége (n= 355) emberi vérből izolált, archivált, anonimizált klinikai gDNS-mintákból állt. A fennmaradó 11 mintát a kereskedelmi forgalomban kapható sejtvonalakból nyerték.

Az e vizsgálatból származó adatokat kiegészítették a reprodukálhatósági vizsgálatban értékelt 68 sejtvonal-minta, az extrakciós módszert értékelő analitikai vizsgálatból származó 14 klinikai minta és 52 szintetikus plazmidminta pontossági adataival. A szintetikus plazmidokat úgy tervezték, hogy tartalmazzák a ritka variánsok genomikus környezetét, és egy összeállításban egytől kilencig terjedő számú variánst tartalmaztak. Ezeket lineárisan változtatták, a genomiális DNS-nek megfelelő másolatszámra hígították, és ugyanekkora másolatszámú vad típusú genotípusú humán genomiális DNS-mintákkal keverték, hogy heterozigóta mintát utánozzon.

Az SNV-eket és kis InDel-eket tartalmazó 137 pozíció genotipizálási eredményeit, beleértve a PolyTG/PolyT régiót is, összehasonlították a Sanger-féle kétirányú szekvenálás eredményével. A panelben szereplő két nagy delécióhoz referencia-módszerként két validált PCR-alapú vizsgálatot használtak. Mindegyik duplex PCR-vizsgálatban két primerkészlet használatával történt a vad típusú, a heterozigóta és a homozigóta genotípusok megkülönböztetése. Az egyik primerkészlet a deléciós töréspontokkal szomszédosan helyezkedett el, míg a másik tartalmazta a deléció pozícióját. A két terméket agarózgélben, méret szerint választották szét.

A PCR-vizsgálatokat egy 28 mintából álló panel segítségével validálták (22 minta minden egyes delécióhoz), amely sejtvonalból és vérből származó genomikus DNS-mintákból és szintetikus plazmidokból állt, és amely minden egyes nagy deléció esetében magában foglalta a WT, HET és HOM genotípusokat. A PCR-vizsgálatok 100%-os specifitását és reprodukálhatóságát minden vizsgált minta esetében megerősítették a PCR-termékek agarózgélben történő értékelésével. A PCR-vizsgálatok pontosságát Sanger-féle szekvenálással igazolták, és minden minta esetében 100%-osnak találták.

A pontosságot minden egyes genotípus esetében három statisztikai mérőszámmal fejezték ki. A pozitív egyezés (PA) kiszámítása az egyes variáns genotípusok esetében: a megegyező variánsazonosításokkal rendelkező minták száma osztva a referencia-módszerekkel azonosított, az adott variánssal rendelkező minták teljes számával. A negatív egyezés (NA) kiszámítása az összes vad típusú (WT) pozíciónál: a megegyező vad típusú pozíciók száma osztva a referencia-módszerekkel azonosított vad típusú pozíciók teljes számával. A teljes egyezés (OA) kiszámítása az összes mintánál: a megegyező vad típusú és variáns pozíciók száma osztva a referencia-módszerekkel azonosított összes jelentett pozíció számával.

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat genotípus szintű teljes PA értéke 100% volt. Az összes WT pozíció NA értéke > 99,99% volt, és az összes jelentett pozíció OA értéke > 99,99% volt. Minden eredmény az első vizsgálat eredményein alapul.

14. táblázat: A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat összesített pontossága

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_ 2052del AAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2 053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_21 76insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-2 6A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X (C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3 774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23 [§]	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 [§]	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A [¶]	SNV	c.2490+1G>T [¶]	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P [^]	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 [^]	0	100	100	100
Y1092X (C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variáns (közös név)	Variáns típusa	cDNS-név	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3 885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT [€]	PolyTG/PolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N.a.	100
I506V [¥]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N.a.	100	100
I507V [¥]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N.a.	100	100
F508C [¥]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N.a.	100	100
Összes			67522		557		66965	1	0	100	>99,99	>99,99

A DIV a deléció/inzerció variáns rövidítése.

* A Sanger-féle szekvenálásra vonatkozó jelentés szerint a P205S variáns heterozigóta a klinikai mintában. A Sanger-féle szekvenálás követési adatainak felülvizsgálata azonban azt mutatta, hogy a variáns valójában homozigóta volt, és tévesen jelentették. Az MiSeqDx a variánst homozigótaként jelentette.

§ A rendszer a 8. exonra heterozigóta szintetikus mintát a CFTR dele22, 23 variánsra heterozigótaként jelentette. A további vizsgálatok kimutatták, hogy ez az eredmény valószínűleg kis mennyiségű szennyeződésből származik.

^ Az eredeti szintetikus heterozigóta mintáról megállapították, hogy nem megfelelően készítették el. Később, miután ismét elkészítették, ugyanazon plazmid felhasználásával vizsgálták, és kimutatható volt.

€ Ha az R117H pozitív, a rendszer jelenti a PolyTG/PolyT variánst is.

¥ Egy homozigóta F508del variáns esetében három olyan vad típusú bázist (azaz az I506V, I507V, F508C variánsokat) is jelentettek, amelyeket a rendszer nem azonosított a mintában.

¶ A vizsgálat eredeti validációs vizsgálata 2 szintetikus mintát tartalmazott, amelyek a 2622+1 G>A variánshoz a c.2490+1G>T nukleotidváltást tartalmazták (az adatok szerepelnek ebben a táblázatban). Később egy második validációs vizsgálatot végeztek a c.2490+1G>A nukleotidváltást tartalmazó szintetikus mintával a variánssal járó tényleges nukleotidváltás (c.2490+1G>A) alátámasztására.

15. táblázat: A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat pontossága az I506V, I507V és F508C esetében.

Variáns (közös név)	Azonosítások száma variánsenként	Pozitív azonosítások (variánsok)			Negatív azonosítások (vad típus)	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
		Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

16. táblázat: A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat összesített pontossága a PolyTG/PolyT variánsok esetében

PolyTG/PolyT genotípus	Klinikai minták száma	Sejtvonalból származó minták száma	Szintetikus minták száma	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma*	Százalékos pontosság
(TG)9(T)7/(TG)11 (T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10 (T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11 (T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11 (T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11 (T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12 (T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12 (T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	7	6	0	0	0	100

PolyTG/PolyT genotípus	Klinikai minták száma	Sejtvonalból származó minták száma	Szintetikus minták száma	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma*	Százalékos pontosság
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Összes**		448		4	3	98,44

* A mintákat nem vizsgálták újra.

^ Az egyik ellentmondásos eredmény a reprodukálhatósági vizsgálatból származik. A minta PolyTG/PolyT eredménye mind a 18 replikátumban egybehangzó volt, de eltért a kétirányú Sanger-féle szekvenálás eredményétől.

** A PolyTG/PolyT variáns teljes mintaszáma 448, mivel az összes szintetikus minta (n = 52) linearizált plazmidok és a reprodukálhatósági vizsgálat részét képező két sejtvonal minta egyikének keverésével készült. Mivel a PolyTG/PolyT variáns jelentése e további szintetikus minták esetében a variáns túlzott mértékű jelentését eredményezné, a szintetikus mintákat kizárták ebből az elemzésből.

Reprodukálhatóság

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat reprodukálhatóságát három vizsgálati helyszínen, két kezelővel végzett vak vizsgálatban határozták meg. Mindegyik helyszínen két jól jellemzett, egyenként 46 mintából álló panelt vizsgált mindkét kezelő, ami helyszínenként összesen 810 azonosítást jelentett. A panelek a *CFTR* gén ismert variánsait hordozó limfoblasztoid sejtvonalakból származó genomikus DNS-ek keverékét, valamint a *CFTR* gén ismert variánsaival rendelkező limfoblasztoid sejtvonalakkal kiegészített, leukocitamentes vért tartalmaztak. Azért használtak vérmintákat, hogy értékelni lehessen a vizsgálati munkafolyamat elsődleges bemeneteként szolgáló gDNS előállításához használt extrakciós lépéseket.

A minták sikerességi aránya, vagyis az első próbálkozás alkalmával megfelelő minőség-ellenőrzési mérőszámokat adó minták aránya 99,9% volt.

Az összes variánssra vonatkozó genotípus szintű megegyezés 99,77% volt. Az összes WT-pozícióra vonatkozó negatív megegyezés 99,88%, az összes jelentett pozícióra vonatkozó teljes megegyezés pedig 99,88% volt. Minden eredmény az első vizsgálat eredményein alapul. A reprodukálhatósági vizsgálatban nem végeztek ismételt vizsgálatot.

17. táblázat: A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat reprodukálhatósága

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Varián-sok	Azonosítá-sok teljes száma helyszínen-ként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítá-sok (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítá-sok (vad típus)			Helytelen azonosítá-sok száma	Sikertelen azonosítá-sok száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1. helyszí-n	2. helyszí-n	3. helyszí-n	1. helyszí-n	2. helyszí-n	3. helyszí-n					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Variánsok	Azonosítások teljes helyszíneként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítások (vad típus)			Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín					
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nincs jelen	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Varián- sok	Azonosít- ások teljes száma helyszínen- ként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosít- ások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosít- ások (vad típus)			Helytelen azonosít- ások száma	Sikertelen azonosít- ások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín					
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Varián- sok	Azonosí- tások teljes száma helyszínen- ként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosí- tások (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosí- tások (vad típus)			Helytelen azonosí- tások száma	Sikertelen azonosí- tások száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín					
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100

Panel	Minták száma	Minta genotípusa	Varián- sok	Azonosítá- sok teljes száma helyszínen- ként	Pozitív megegyezést tartalmazó azonosítá- sok (variánsok)			Negatív megegyezést tartalmazó azonosítá- sok (vad típus)			Helytelen azonosítá- sok száma	Sikertelen azonosítá- sok száma	Pozitív egyezés (%)	Negatív egyezés (%)	Teljes egyezés (%)
					1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín					
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 [§]	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 [^]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 [^]	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 [§]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.a.	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

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

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

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

** A bizonyítékok arra utalnak, hogy a 9. és 10. mintát valószínűleg felcserélte a kezelő a könyvtár-előkészítés előtt.

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

18. táblázat: Kiegészítő információk a reprodukálhatósági vizsgálatban szereplő variánsokról

Variáns (közös név)	Variáns típusa	CTFR gén területe
PolyTG/PolyT	Összetett DIV*	9. intron
2183AA>G	Összetett DIV*	14. exon
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1-Intron3
1154insTC	DIV*	8. exon
I507del	DIV*	11. exon
F508del	DIV*	11. exon
2143delT	DIV*	14. exon
3659delC	DIV*	22. exon
3876delA	DIV*	23. exon
394delTT	DIV homopolimer területen*	3. exon
1078delT	DIV homopolimer területen*	8. exon
2184delA	DIV homopolimer területen*	14. exon
3905insT	DIV homopolimer területen*	23. exon
E60X	SNV	3. exon
R75X	SNV	3. exon
G85E	SNV	3. exon
E92X	SNV	4. exon
R117H	SNV	4. exon
Y122X	SNV	4. exon
621+1G>T	SNV	4. intron
G178R	SNV	5. exon
711+1G>T	SNV	5. intron
L206W	SNV	6. exon
G330X	SNV	8. exon
R334W	SNV	8. exon
I336K	SNV	8. exon
R347P	SNV	8. exon
R347H	SNV	8. exon
A455E	SNV	10. exon
Q493X	SNV	11. exon
1717-1G>A	SNV	11. intron
G542X	SNV	12. exon
S549N	SNV	12. exon
S549R (c.1647T>G)	SNV	12. exon
G551D	SNV	12. exon
R553X	SNV	12. exon
R560T	SNV	12. exon
1812-1 G>A	SNV	12. intron

Variáns (közös név)	Variáns típusa	CTFR gén területe
1898+1G>A	SNV	13. intron
W846X	SNV	15. exon
2789+5G>A	SNV	16. intron
3120+1G>A	SNV	18. intron
3272-26A>G	SNV	19. intron
Y1092X (C>A)	SNV	20. exon
M1101K	SNV	20. exon
R1158X	SNV	22. exon
R1162X	SNV	22. exon
3849+10kbC>T	SNV	22. intron
W1282X	SNV	23. exon
N1303K	SNV	24. exon

* A DIV a deléció/inzerció variáns rövidítése.

DNS-extrakció

Három gyakran alkalmazott, a kereskedelemben kapható kivonási módszert, vagyis a mágneses gyöngyökkel, az alkoholos kicsapással, illetve a szilikon szűrőoszloppal végzett módszert értékelték alvadásgátolt teljes vérrrel. A vizsgálatban összesen 14 egyedi vérmintát használtak fel, amelyek genotípusa vad típusú vagy három mutáns egyike volt (három mintában volt jelen F508del, egy mintában I506V és egy mintában D110H). A három DNS-extrakciós módszert külön vizsgálta két különböző felhasználó, akik kivonási módszerként három szekvenálási futtatást végeztek. Mindegyik extrakciót mindegyik felhasználó különböző napon végezte. A kivont gDNS-minták DNS-koncentrációját és A260/A280 arányát megmérték spektrofotometriával. A vizsgálatban mindegyik extrakciós módszernél a minták teljes száma 168 volt (14 minta x 2 felhasználó/módszer x 3 futtatás/felhasználó x 2 ismétlés/kivont gDNS-minta).

Kivonási módszer	Vizsgált minták száma	Azonosítási arány	Pontosság	Minta első sikerességi aránya*
Alkoholos kicsapás	168	100%	100%	100%
Szilikon szűrőoszlopos elválasztás	168	100%	100%	100%
Mágneses gyöngyökkel végzett kivonás	168	100%	100%	100%

* Az első futtatásban $\geq 99\%$ -os azonosítási arányú minták százalékos aránya.

Bemeneti DNS mennyisége

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat esetében a bevitt DNS mennyiségének tartományát egy sorozatos hígítási vizsgálatban értékelték, amelyben 16 egyedi CF-variánst tartalmazó 14 reprezentatív mintát értékelték. Mindegyik mintát a bevitt DNS kilencféle mennyiségével vizsgálták 1250 ng és 1 ng között (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng és 10 ng, 5 ng és 1 ng). A pontosság meghatározásához a minták genotípusait összehasonlították a kétirányú Sanger-féle szekvenálással kapott adatokkal; a deléciókat PCR-vizsgálat eredményeivel hasonlították össze. A bevitt DNS-mennyiség felső és alsó határaként 1250 ng-ot, illetve 25 ng-ot határoztak meg, mivel ezeknél a minták első sikerességi aránya $\geq 95\%$ volt, és nem történt hibás azonosítás (100%-os pontosság és azonosítási arány).

Az 1250 ng, 250 ng és 100 ng mennyiséget DNS-beviteli szintenként legalább négy reprezentatív DNS-mintával és 20 ismétléssel vizsgálták ($n = 4 \times 20 = 80$ minta), míg a 25 ng-os alsó határt 14 mintával és mintánként 20 ismétléssel ($n = 14 \times 20 = 280$ minta). Mindegyik DNS-mennyiség esetén a pontosság és az első sikerességi arány 100% volt.

Az eredmények azt mutatják, hogy a cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat a 1250–25 ng DNS-beviteli tartományban használható pontos eredményekkel.

Zavaró anyagok

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat működését zavaró anyagok hatásának vizsgálata céljából értékelték a vizsgálat potenciálisan zavaró anyagok jelenlétében vagy hiányában tapasztalt teljesítményét. A vizsgálatban nyolc teljesvér-mintát vizsgáltak, köztük három CF-pozitív, egyedi genotípusú mintát. Négy endogén anyag (bilirubin, koleszterin, hemoglobin és triglicerid) vizsgálatához azokat hozzáadták a vérmintákhoz a DNS kivonása előtt. Az egyes anyagok koncentráció-határértékei a következő táblázatban láthatók. Továbbá a vérvételből eredő interferencia (túl kevés vér levétele) értékeléséhez EDTA-t adtak a vérmintákhoz; a minta-előkészítésből eredő zavaró hatás értékelésére a szilikon szűrőoszlopos elválasztási módszer utolsó mosópufferét hozzáadták a tisztított genomikus DNS-hez.

A cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat 100%-os azonosítási arányt értek el az összes vizsgált minta esetében, valamint a genotípus-azonosítás 100%-os reprodukálhatóságát a zavaró anyagok jelenlétében és hiányában vizsgált minták között.

A multiplexelő indexprimerek által okozott interferencia hatásának vizsgálatára keresztkontaminációs vizsgálatot végeztek két olyan mintával, amelyek mindegyike négy különböző genomikus pozícióban egyedi homozigóta genotípussal rendelkezett, illetve két indexprimerrel. Ha a szennyezettségi szint $< 40\%$ volt, nem változott a variánsazonosítás. Ha a szennyezettségi szint $\geq 40\%$ volt, a minta genotípusa heterozigóta lett.

Egyik endogén vagy exogén zavaró tényező sem okozott interferenciát.

Vizsgált anyag	Ismétlések teljes száma	Vérkoncentráció (felső határérték)	Vérkoncentráció (alsó határérték)	Azonosítási arány
Bilirubin	16	684 $\mu\text{mol/L}$	137 $\mu\text{mol/L}$	100%
Koleszterin	16	13 mmol/L	2,6 mmol/L	100%
Hemoglobin	16	2 g/L	0,4 g/L	100%
Triglicerid	16	37 mmol/L	7,4 mmol/L	100%
EDTA	16	7,0 mg/mL	2,8 mg/mL	100%

Mintaindexelés

A vizsgálat során a mintaindexprimerek egy egyedi „vonalkódot” rendelnek minden egyes minta-DNS-hez, lehetővé téve több minta összevonását egyetlen szekvenálási futtatásban. Összesen 96 mintaindexet vizsgáltak nyolc egyedi DNS-mintával annak ellenőrzése érdekében, hogy a vizsgálattal lehet-e következetesen genotipizálást végezni egy minta esetében különböző indexprimer-kombinációkkal. Mindegyik egyedi mintát 12 különböző indexprimer-kombinációval vizsgáltak. A minták eredményeit összehasonlították a kétirányú Sanger-féle szekvenálással kapott adatokkal mindegyik pozíció/variáns esetében, kivéve a két nagy deléciót, amelyek eredményeit duplex PCR-vizsgálat eredményeivel hasonlították össze. A reprodukálhatóság és a pontosság 100%-os volt minden minta-indexprimer kombináció esetében.

A teljesítmény egyenértékűsége az Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálatával

A TruSight cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálatához (TruSight CF139) ugyanaz a könyvtár-előkészítési munkafolyamat és ugyanazok a reagensek használatosak, mint a Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálatához (MiSeqDx CF139). A TruSight CF139 vizsgálatához az MiSeqDx reagenskészlet v3, míg az MiSeqDx CF139 vizsgálatához a hozzá mellékelt reagensek használatosak. A TruSight CF139 és az MiSeqDx CF139 egyenértékűségének bizonyításához kilenc TruSight CF139 futtatás eredményét hasonlították össze az aranymérce,

az MiSeqDx CF139 egyetlen futtatásának eredményével. A TruSight CF139 futtatások 96 mintával történtek (ez a TruSight CF139 maximális mintafeldolgozási teljesítménye), az MiSeqDx CF139 pedig 48 mintával (ez az MiSeqDx CF139 maximális mintafeldolgozási teljesítménye). A TruSight CF139 futtatásoknál a variabilitás forrásai a következők voltak: három könyvtár-előkészítési művelet (különböző TruSight CF tételekkel), három kezelő, három MiSeqDx készülék és három MiSeqDx reagenskészlet v3.

A TruSight CF139 futtatásokkal kapott variánsazonosítási eredményeket hasonlították össze az MiSeqDx CF139 variánsazonosítási eredményével. Mindegyik TruSight CF139 futtatásban 47 egyedi minta szerepelt, mintánként 2–3 példányban (95 DNS-minta és 1 NTC). Az MiSeqDx CF139 futtatásban ugyanaz a 47 minta szerepelt egy-egy példányban (47 DNS-minta és 1 NTC). A mintapanel a Coriell által szállított, immortalizált sejtvonalakból kivont DNS-mintákból állt; ezek tartalmazták az ACMG által ajánlott 23 mutáció minden allélját: deléciós-inzerciós variánsokat (beleértve a homopolimer régiókban történő inzerció-deléció kombinációkat és az ugyanabban a régióban történő inzerció és deléció kombinációját), homozigóta variánsokat, összetett heterozigóta variánsokat, a célzott nagy méretű deléciók egyikét, egy gyakori PolyTG/PolyT variánst, számos egynukleotid-variánst és egy olyan mintát, amelyben nem volt kimutatható variáns. Az [19. táblázat](#) található az eredmények genotípusonként összefoglalva. A [20. táblázat](#) tartalmazza a vizsgálatok közötti egyezést variánstípusonként. A vizsgálatok közötti összesített egyezés >99,99% volt.

19. táblázat: A TruSight CF 139 variáns vizsgálat és az MiSeqDx CF 139 variáns vizsgálat variánsazonosítási teljesítményének összehasonlítása

		MiSeqDx CF 139 variáns vizsgálat				Összes
		HOM variáns	HET variáns	Vad típus	Nincs azonosítás	
TruSight CF 139 variáns vizsgálat	HOM variáns	87	-	-	-	87
	HET variáns	-	1 098	-	-	1 098
	Vad típus	-	-	113 889	-	113 889
	Nincs azonosítás	-	-	-	-	-
	Összes	87	1 098	113 889	-	115 074

20. táblázat: A TruSight CF 139 variáns vizsgálat és az MiSeqDx CF 139 variáns vizsgálat teljesítményének összehasonlítása variánstípusonként

Variáns típusa	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Egyezés az MiSeqDx CF 139 vizsgálatl
SNV	672	0	0	100,00% (672/672)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	495	0	0	100,00% (495/495)
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44% (17/18)
Nincs (vad típus)	113 889	0	0	100,00% (113 889/113 889)
Összes	115 091	1	0	>99,99% (115 091/115 092)

A TruSight CF139 és az MiSeqDx CF139 eredményei között egyetlen eltérő azonosítás volt. A helytelen azonosítás a PolyTG/PolyT variáns esetében következett be. A PolyTG/PolyT variánsok egyezésének összefoglalása a [21. táblázat](#) található. Mivel a PolyTG/PolyT genotípust a vizsgálat csak akkor jelenti, ha az R117H variáns is jelen van, az adatkészlet csak egyetlen DNS-forrásból származó PolyTG/PolyT azonosításokat tartalmaz.

21. táblázat: A TruSight CF 139 variáns vizsgálat és az MiSeqDx CF 139 variáns vizsgálat PolyTG / PolyT variánsra vonatkozó azonosítási teljesítményének összehasonlítása

		MiSeqDx CF 139 variáns vizsgálat			Összes
		(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	Nincs azonosítás	
TruSight CF 139 variáns vizsgálat	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	-	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	-	-	1
	Nincs azonosítás	-	-	-	-
	Összes	18	-	-	18

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat teljesítményjellemzői

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat teljesítményjellemzői az MiSeqDx cisztás fibrózis 139 variáns vizsgálat teljesítményét értékelő vizsgálatokon alapulnak. A TruSight és az MiSeqDx vizsgálatok egyenértékűségéről lásd: [A teljesítmény egyenértékűsége az Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálatával, 92. oldal.](#)

Pontosság

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat pontosságát négy különböző forrásból származó, a CFTR-variánsok széles skáláját képviselő 500 minta értékelésével vizsgálták. A pontossági adatok elsődleges forrása egy 366 mintából álló panellel végzett klinikai pontossági vizsgálat volt. A minták többsége (n= 355) emberi vérből izolált, archivált, anonimizált klinikai gDNS-mintákból állt. A fennmaradó 11 mintát a kereskedelmi forgalomban kapható sejtvonalakból nyerték.

Az e vizsgálatból származó adatokat kiegészítették a reprodukálhatósági vizsgálatban értékelt 68 sejtvonal-minta, az extrakciós módszert értékelő analitikai vizsgálatból származó 14 klinikai minta és 52 szintetikus plazmidminta pontossági adataival. A szintetikus plazmidokat úgy tervezték, hogy tartalmazzák a ritka variánsok genomikus környezetét, és egy összeállításban 1-től 10-ig terjedő számú variánst tartalmaztak. Ezeket lineárisra változtatták, a genomialis DNS-nek megfelelő másolatszámra hígították, és ugyanekkora másolatszámú vad típusú genotípusú humán genomialis DNS-mintákkal keverték, hogy heterozigóta mintát utánozzon.

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat esetében összesen 5206 pozíciót hasonlítottak össze a referencia-módszerekkel: a Sanger-féle kétirányú szekvenálással és a PCR-vizsgálattal. Az SNV-eket és kis InDel-eket tartalmazó pozíciók genotipizálási eredményeit, beleértve a PolyTG/PolyT régiót is, összehasonlították a Sanger-féle kétirányú szekvenálás eredményével.

A panelben szereplő két nagy delécióhoz referencia-módszerként két validált PCR-alapú vizsgálatot használtak. Mindegyik duplex PCR-vizsgálatban két primerkészlet használatával történt a vad típusú, a heterozigóta és a homozigóta genotípusok megkülönböztetése. Az egyik primerkészlet a deléciós töréspontokkal szomszédosan helyezkedett el, míg a másik tartalmazta a deléció pozícióját. A két terméket agarózgélben, méret szerint választották szét. A PCR-vizsgálatokat egy összesen 28 mintából álló panel segítségével validálták (22 minta minden egyes delécióhoz), amely sejtvonalból és vérből származó genomikus DNS-mintákból és szintetikus plazmidokból állt, és amely minden egyes nagy deléció esetében magában foglalta a WT, HET és HOM genotípusokat. A PCR-vizsgálatok 100%-os specifikitását és reprodukálhatóságát minden vizsgált minta esetében megerősítették a PCR-termékek agarózgélben történő értékelésével. A PCR-vizsgálatok pontosságát Sanger-féle szekvenálással igazolták, és minden minta esetében 100%-osnak találták.

A pontosságot minden egyes genotípus esetében három statisztikai mérőszámmal fejezték ki. A pozitív egyezés (PA) kiszámítása az egyes variáns genotípusok esetében: a megegyező variánsazonosításokkal rendelkező minták száma osztva a referencia-módszerekkel azonosított, az adott variánssal rendelkező minták teljes számával. A negatív

egyezés (NA) kiszámítása az összes vad típusú (WT) pozíciónál: a megegyező vad típusú pozíciók száma osztva a referencia-módszerekkel azonosított vad típusú pozíciók teljes számával. A teljes egyezés (OA) kiszámítása az összes mintánál: a megegyező vad típusú és variáns pozíciók száma osztva a referencia-módszerekkel azonosított összes jelentett pozíció számával.

A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat genotípuszintű PA értéke 99,66% volt a PolyTG/PolyT variánsok beleszámítása esetén (a PolyTG/PolyT variánsok nélkül 100%). Az összes WT pozíció NA értéke > 99,99% volt, és az összes jelentett pozíció OA értéke > 99,99% volt.

22. táblázat: A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat összesített pontossága

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	DEL	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
D110H	c.328G>C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
E279D	c.837A>T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTG/PolyT	N.a.	PolyTG/ PolyT	Intron9	369	79	52	3	4 [#]	98.60

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
P574H	c.1721C>A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0 ^y	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exon22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exon23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exon24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100

Genotípus (közös név/cDNS- név/koordináta)	cDNS-név	Variáns típusa	CTFR gén területe (hg19)	Pozitív azonosítások (variánsok)			Sikertelen azonosítások*	Helytelen azonosítások	Pozitív egyezés
				Klinikai minták	Sejtvonalból származó minták	Szintetikus minták			
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	DEL	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
Összes variáns száma (PA)†					2072		3	4	99,66
Összes WT (NA)					2600928		1	2 [§]	>99,99
Összes WT és variáns száma (OA)					2603000		4	6	>99,99

A DIV a deléció/inzerció variáns rövidítése.

* A mintákat nem vizsgálták újra.

^ A szoftver nem adja meg a cDNS-nevet ehhez a genomikus koordinátaéhoz.

** A Sanger-féle szekvenálásra vonatkozó jelentés a P205S variánst a klinikai mintában heterozigotaként sorolta fel. A Sanger-féle szekvenálás követési adatainak felülvizsgálata azonban azt mutatta, hogy a variáns valójában homozigóta volt, és tévesen jelentették. Az MiSeqDx a variánst homozigotaként jelentette.

Az egyik ellentmondásos eredmény a reprodukálhatósági vizsgálatból származik. A minta PolyTG/PolyT eredménye mind a 18 replikátumban egybehangzó volt, de eltért a kétirányú Sanger-féle szekvenálás eredményétől.

* Az eredeti szintetikus heterozigóta mintáról megállapították, hogy nem megfelelően készítették el. Később, miután ismét elkészítették, ugyanazon plazmid felhasználásával vizsgálták, és kimutatható volt.

† A PA a PolyTG/PolyT azonosítások kivételével 100% volt.

§ A rendszer a 8. exonra heterozigóta szintetikus mintát a CFTR dele22, 23 variánssra heterozigotaként jelentette. A további vizsgálatok kimutatták, hogy ez az eredmény valószínűleg kis mennyiségű szennyeződésből származik. Ezenkívül egy másik minta esetében a Sanger-primerek nem tudták teljes mértékben kimutatni a Q1463Q variánst a variáns helye előtti és utáni indek miatt.

23. táblázat: A PolyTG/PolyT variáns azonosításának pontossága a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat esetén

PolyTG/PolyT genotípus	Klinikai minták száma	Sejtvonalból származó minták száma	Szintetikus minták száma	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma*	Százalékos pontosság
(TG)9(T)7/(TG)11 (T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10 (T)7	1	0	0	0	0	100

PolyTG/PolyT genotípus	Klinikai minták száma	Sejtvonalból származó minták száma	Szintetikus minták száma	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma*	Százalékos pontosság
(TG)9(T)9/(TG)11 (T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11 (T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11 (T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12 (T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12 (T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11 (T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11 (T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12 (T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11 (T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	52	8	0	0	0	100

PolyTG/PolyT genotípus	Klinikai minták száma	Sejtvonalból származó minták száma	Szintetikus minták száma	Helytelen azonosítások száma	Sikertelen azonosítások száma*	Százalékos pontosság
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Összes		448		4	3	98,44

* A mintákat nem vizsgálták újra.

^ Az egyik ellentmondásos eredmény a reprodukálhatósági vizsgálatból származik. A minta PolyTG/PolyT eredménye mind a 18 replikátumban egybehangzó volt, de eltért a kétirányú Sanger-féle szekvenálás eredményétől.

Reprodukálhatóság

A Cisztás klinikai szekvenálási vizsgálat reprodukálhatóságát 3 vizsgálati helyszínen, 2 kezelővel végzett vak vizsgálatban határozták meg. Minden helyszínen két jól jellemzett, egyenként 46 mintából álló panelt vizsgált mindkét kezelő, ami kezelőnként összesen 276 mintaeredményt jelentett. A panel a *CFTR* gén ismert mutációit hordozó limfoblasztoid sejtvonalakból származó genomikus DNS-ek keverékét, valamint a *CFTR* gén ismert mutációival rendelkező limfoblasztoid sejtvonalakkal kiegészített, leukocitamentes vért tartalmaztak. Azért használtak vérmintákat, hogy értékelni lehessen a vizsgálati munkafolyamat elsődleges bemeneteként szolgáló gDNS előállításához használt extrakciós lépéseket.

A minták sikerességi aránya, vagyis az első próbálkozás alkalmával megfelelő minőség-ellenőrzési mérőszámokat adó minták aránya 99,7% volt. Minden eredmény az első vizsgálat eredményein alapul.

A genotípuszintű PA értéke 99,22% volt a PolyTG/PolyT variánsok beleszámítása esetén, a PolyTG/PolyT variánsok nélkül pedig 99,60%. Az összes WT pozíció NA értéke 99,70% volt, és az összes jelentett pozíció OA értéke 99,70% volt. A PolyTG/PolyT variáns PA értéke 97,83% volt.

24. táblázat: A cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat reprodukálhatósága (a PolyTG/PolyT variánsok nélkül)

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Meg egyező azonosítá sok			Összes* (mindegyik vizsgáló helyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgáló helyenként	Összes vizsgáló helyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítá sok [€]	Helytelen azonosítá sok	
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X (C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Minta	HGVS név (vagy pozíció, ha nincs HGVS)	Variáns neve	Összes eredmény		Megegyező azonosítások			Összes* (mindegyik vizsgálóhelyen)		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Sikertelen azonosítások [€]	Helytelen azonosítások	
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Összes variáns (PA)** (a 25. táblázat található PolyTG/PolyT adatokkal együtt)			2 580	7 740	2 562	2 553	2 565	37	23	99,22
Összes WT (NA)			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Összes WT és variáns száma (OA)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

[€] A mintákat nem vizsgálták újra.

[^] Az 5. és a 75. minta egy ismétlése alkalmával 0% volt az azonosítási arány. További vizsgálatok azt mutatták, hogy a mintákat valószínűleg nem adták hozzá a mintalemezhez a könyvtár-előkészítés előtt.

^{*} Az ellenőrzés során kiderült, hogy a 9. és 10. mintát valószínűleg felcserélte a kezelő a könyvtár-előkészítés előtt.

^{**} A PolyTG/PolyT variánsok nélkül a PA 99,60% volt.

25. táblázat: A PolyTG/PolyT variánsok azonosításának reprodukálhatósága a cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálattal

Panel	Minta	Genotípus	Eredmények száma		Meg egyező azonosítások			Mindegyik vizsgálóhelyen összesen		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Nincs azonosítás	Helytelen azonosítások	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%

Panel	Minta	Genotípus	Eredmények száma		Megegyező azonosítások			Mindegyik vizsgálóhelyen összesen		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Nincs azonosítás	Helytelen azonosítások	
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22%
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78%
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Panel	Minta	Genotípus	Eredmények száma		Megegyező azonosítások			Mindegyik vizsgálóhelyen összesen		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Nincs azonosítás	Helytelen azonosítások	
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44%
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%

Panel	Minta	Genotípus	Eredmények száma		Megegyező azonosítások			Mindegyik vizsgálóhelyen összesen		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Nincs azonosítás	Helytelen azonosítások	
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Panel	Minta	Genotípus	Eredmények száma		Megegyező azonosítások			Mindegyik vizsgálóhelyen összesen		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Nincs azonosítás	Helytelen azonosítások	
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88.89%
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100%

Panel	Minta	Genotípus	Eredmények száma		Megegyező azonosítások			Mindegyik vizsgálóhelyen összesen		Százalékos egyezés
			Vizsgálóhelyenként	Összes vizsgálóhelyen	1. helyszín	2. helyszín	3. helyszín	Nincs azonosítás	Helytelen azonosítások	
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
PolyTG/PolyT variánsok összesen (PA)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83%

* Mind a 18 minta eredménye megegyezett, azonban Sanger-féle kétirányú szekvenálással eltérőek voltak.

DNS-extrakció

Három gyakran alkalmazott, a kereskedelemben kapható kivonási módszert, vagyis a mágneses gyöngyökkel, az alkoholos kicsapással, illetve a szilikon szűrőoszloppal végzett módszert értékelték K₂EDTA-val alvadásgátolt teljes vérrel. A vizsgálat során összesen 14 vérmintát használtak fel; kettő vad típusú volt, míg a fennmaradó minták kilenc különböző variánst, gyakori és ritka variánsokat is, tartalmazó egyedi genotípust hordoztak. A polyTG/polyT variáns esetén (T)5–9 és (TG)10–12 genotípusú minták szerepeltek. A három DNS-extrakciós módszert külön vizsgálta két különböző felhasználó, akik kivonási módszerként három szekvenálási futtatást végeztek. Mindegyik extrakciót mindegyik felhasználó különböző napon végezte. A kivont gDNS-minták DNS-koncentrációját és A260/A280 arányát megmérték spektrofotometriával. A vizsgálatban mindegyik extrakciós módszernél a minták teljes száma 168 volt (14 minta x 2 felhasználó/módszer x 3 futtatás/felhasználó x 2 ismétlés/kivont gDNS-minta).

Kivonási módszer	Vizsgált minták száma	Azonosítási arány	Pontosság	Minta első sikerességi aránya*
Alkoholos kicsapás	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Szilikon szűrőoszlopos elválasztás	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Mágneses gyöngyökkel végzett kivonás	168	> 99,99%	> 99,99%	100%

* Az első futtatásban > 99%-os azonosítási arányú minták százalékos aránya.

Bemeneti DNS mennyisége

A tisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat esetében a bevitt DNS mennyiségének tartományát egy sorozatos hígítási vizsgálatban értékelték, amelyben 16 egyedi CF-variánst tartalmazó 14 reprezentatív mintát értékelték. Mindegyik mintát a bevitt DNS 9-féle mennyiségével vizsgálták 1250 ng és 1 ng között (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng és 10 ng, 5 ng és 1 ng). A pontosság meghatározásához a minták genotípusait összehasonlították a kétirányú Sanger-féle szekvenálással kapott adatokkal; a deléciókat PCR-vizsgálat eredményeivel hasonlították össze. A bevitt DNS-mennyiség felső és alsó határaként 1250 ng-ot, illetve 25 ng-ot határoztak meg, mivel ezeknél a minták első sikerességi aránya $\geq 95\%$ volt, és nem történt hibás azonosítás (100%-os pontosság és azonosítási arány).

Az 1250 ng, 250 ng és 100 ng mennyiséget DNS-beviteli szintenként legalább 4 reprezentatív DNS-mintával és 20 ismétléssel vizsgálták ($n = 4 \times 20 = 80$ minta), míg a 25 ng-os alsó határt 14 mintával és mintánként 20 ismétléssel ($n = 14 \times 20 = 280$ minta). Mindegyik DNS-mennyiség esetén a pontosság és az első sikerességi arány 100% volt.

Zavaró anyagok

Az Illumina MiSeqDx tisztás fibrózis rendszer működését zavaró anyagok hatásának vizsgálata céljából értékelték a vizsgálat potenciálisan zavaró anyagok jelenlétében vagy hiányában tapasztalt teljesítményét. A vizsgálatban tizenhat egyedi CF-genotípusú teljesvér-mintát vizsgáltak. Négy endogén anyag (bilirubin, koleszterin, hemoglobin és trigliceridek) vizsgálatához azokat hozzáadták a vérmintákhoz a DNS kivonása előtt. Az egyes anyagok koncentráció-határértékei a következő táblázatban láthatók. Továbbá a vérvételből eredő interferencia (túl kevés vér levétele) értékeléséhez EDTA-t adtak a vérmintákhoz; a minta-előkészítésből eredő zavaró hatás értékelésére a szilikon szűrőoszlopos elválasztási módszer utolsó mosópufferét hozzáadták a tisztított genomikus DNS-hez.

A tisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálat 100%-os azonosítási arányt értek el az összes vizsgált minta esetében, valamint a genotípus-azonosítás 100%-os reprodukálhatóságát a zavaró anyagok jelenlétében és hiányában vizsgált minták között. Egyik endogén vagy exogén zavaró tényező sem okozott interferenciát.

A multiplexelő indexprimerek által okozott interferencia hatásának vizsgálatára keresztkontaminációs vizsgálatot végeztek két olyan mintával, amelyek mindegyike négy különböző genomikus pozícióban egyedi homozigóta genotípussal rendelkezett, illetve két indexprimerrel. Ha a szennyezettségi szint $<40\%$ volt, nem változott a variánsazonosítás. Ha a szennyezettségi szint $\geq 40\%$ volt, a minta genotípusa heterozigóta lett.

Vizsgált anyag	Ismétlések teljes száma	Vérkoncentráció (felső határérték)	Vérkoncentráció (alsó határérték)	Azonosítási arány
Bilirubin	16	684 µmol/L	137 µmol/L	100%
Koleszterin	16	13 mmol/L	2,6 mmol/L	100%
Hemoglobin	16	2 g/L	0,4 g/L	100%
Triglicerid	16	37 mmol/L	7,4 mmol/L	100%
EDTA	16	7,0 mg/mL	2,8 mg/mL	100%

A teljesítmény egyenértékűsége az Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálattal

A TruSight cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálathoz (TruSight CFCS) ugyanaz a könyvtár-előkészítési munkafolyamat és ugyanazok a reagensek használatosak, mint a Illumina MiSeqDx cisztás fibrózis klinikai szekvenálási vizsgálathoz (MiSeqDx CFCS). A TruSight CFCS vizsgálathoz az MiSeqDx reagenskészlet v3, míg az MiSeqDx CFCS vizsgálathoz a hozzá mellékelte reagensek használatosak. A TruSight CFCS és az MiSeqDx CFCS egyenértékűségének bizonyításához kilenc TruSight CFCS futtatás eredményét hasonlították össze az aranymérce, az MiSeqDx CFCS egyetlen futtatásának eredményével. A TruSight CFCS futtatások 96 mintával történtek (ez a TruSight CFCS maximális mintafeldolgozási teljesítménye), az MiSeqDx CFCS pedig 48 mintával (ez az MiSeqDx CFCS maximális mintafeldolgozási teljesítménye). A TruSight CFCS futtatásoknál a variabilitás forrásai a következők voltak: három könyvtár-előkészítési művelet (különböző TruSight CF tételekkel), három kezelő, három MiSeqDx készülék és három MiSeqDx reagenskészlet v3.

A TruSight CFCS futtatásokkal kapott variánsazonosítási eredményeket hasonlították össze az MiSeqDx CFCS variánsazonosítási eredményével. Mindegyik TruSight CFCS futtatásban 47 egyedi minta szerepelt, mintánként 2–3 példányban (95 DNS-minta és 1 NTC). Az MiSeqDx CFCS futtatásban ugyanaz a 47 minta szerepelt egy-egy példányban (47 DNS-minta és 1 NTC). A mintapanel a Coriell által szállított, immortalizált sejtvonalakból kivont DNS-mintákból állt; ezek tartalmazták az ACMG által ajánlott 23 mutáció minden allélját: deléció-inzerció variánsokat (beleértve a homopolimer régiókban történő inzerció-deléció kombinációkat és az ugyanabban a régióban történő inzerció és deléció kombinációját), homozigóta variánsokat, összetett heterozigóta variánsokat, a célzott nagy méretű deléciók egyikét, PolyTG/PolyT variánsokat, egynukleotid-variánsokat és egy olyan mintát, amelyben nem volt kimutatható variáns. A 26. táblázat található az eredmények genotípusonként összefoglalva. A 27. táblázat tartalmazza a vizsgálatok közötti egyezést variánstípusonként. A vizsgálatok közötti összesített egyezés >99,99% volt.

26. táblázat: A TruSight CFCS variáns vizsgálat és az MiSeqDx CFCS variáns vizsgálat variánsazonosítási teljesítményének összehasonlítása

		MiSeqDx CF klinikai vizsgálat				
		HOM variáns	HET variáns	Vad típus	Nincs azonosítás	Összes
TruSight CF klinikai vizsgálat	HOM variáns	551	-	-	-	551
	HET variáns	-	2 664	-	-	2 664
	Vad típus	-	-	4 426 182	-	4 426 182
	Nincs azonosítás	-	-	58	-	58
	Összes	551	2 664	4 426 420	-	4 429 455

27. táblázat: A TruSight CF klinikai szekvenálási vizsgálat és az MiSeqDx CF klinikai szekvenálási vizsgálat teljesítményének összehasonlítása variánstípus szerint

Variáns típusa	Helyes azonosítások	Helytelen azonosítások	Nincs azonosítás	Egyezés az MiSeqDx CF klinikai szekvenálási vizsgálattal
SNV	2 684	0	0	100,00% (2 684/2 684)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	513	0	0	100,00% (513/513)
PolyTG/PolyT	847	1	3	99,88% (847/851)
Nincs (vad típus)	4 426 182	0	58	100,00% (4 426 182/4 426 240)
Összes	4 430 244	1	61	>99,99% (4 430 244/4 430 306)

A TruSight CFCS és az MiSeqDx CFCS eredményei között egyetlen eltérő azonosítás volt. A helytelen azonosítás a PolyTG/PolyT variáns esetében következett be. A PolyTG/PolyT variánsok egyezésének összefoglalása a [28. táblázat](#), [94. oldal](#) található.

28. táblázat: A TruSight CF klinikai szekvenálási vizsgálat és az MiSeqDx CF klinikai szekvenálási vizsgálat PolyTG / PolyT variánsra vonatkozó azonosítási teljesítményének összehasonlítása

		MiSeqDx CF klinikai vizsgálat eredményeit bemutató táblázat												
		(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)5	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)10 (T)9/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)11 (T)7/ (TG)11 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)12 (T)5/ (TG)12 (T)5	Nincs azonosítás	Összes
TruSight CF klinikai vizsgálat	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)9	-	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)9/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	72
	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)7	-	-	-	-	-	-	126	-	-	-	-	-	126
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	-	-	-	249	-	-	-	-	249
	(TG)11(T)7/ (TG)11(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	72	-	-	-	72
	(TG)11(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	36
	(TG)12(T)5/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	Nincs azonosítás	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
	Összes	50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-	851

Hivatkozások

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Elérhetőség: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Frissítve 2008. február 19-én.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Elérhetőség: www.uptodate.com. [Online] 2012. december 07.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Elérhetőség: www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] 2013. augusztus.
- 10 Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Elérhetőség: www.cftr2.org. [Online] 2013. augusztus
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Elérhetőség: www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Presented by Garry Cutting on behalf of the CFTR2 Project at the 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) sponsored by the Cystic Fibrosis Foundation. November 04, 2011. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160–1167.
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179–196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

Módosítási előzmények

Dokumentum	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 1000000097720 v03	2022. május	<ul style="list-style-type: none"> A teljes dokumentum tartalmának frissítése az MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (katalógusszám: 20063860) és a hozzá tartozó munkafolyamat figyelembe vétele érdekében. A Megjegyzések az eljáráshoz szakaszon belül a Minta-előkészítés alszakasz létrehozása és a DNS-extrakcióval és mennyiségének meghatározásával kapcsolatos információk áthelyezése ebbe az alszakaszba. Nyilatkozat hozzáadása a Figyelmeztetések és óvintézkedések részhez, amely szerint az ezzel a termékkel kapcsolatos súlyos eseményeket jelenteni kell az Illumina vállalatnak és az illetékes hatóságnak. A termék címkéi című szakasz kiegészítése a biztonságra és a teljesítményre vonatkozó összefoglaló nyilatkozattal és az alapvető UDI-DI azonosítóval. A TM ikon elhelyezésének javítása a termék áttekintésénél. A Megjegyzés, a Figyelem és a Vigyázat ikon frissítése. A módosítási előzményeket tartalmazó táblázat kitöltése.
Dokumentumszám: 1000000097720 v02	2021. augusztus	Módosítási előzményeket tartalmazó táblázat hozzáadása. Az európai uniós meghatalmazott képviselő címének frissítése.
Dokumentumszám: 1000000097720 v01	2020. június	Az MiSeqDx Reagent Kit v3 új cikkszámának (20037124) hozzáadása.
Dokumentumszám: 1000000097720 v00	2020. március	Első kiadás.

Szabadalmak és védjegyek

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

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

Az AMPure, a Beckman és a Beckman Coulter a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei.

Elérhetőségek



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



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

Ausztrál szponzor

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

Termékcímke

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

A Biztonságosságra és a teljesítőképességre vonatkozó összefoglaló (SSP) a <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> címen található az Orvostechnikai eszközök európai adatbázisának (Eudamed) elindítását követően. Az alapvető UDI-DI azonosítóhoz (0081627002CYSTFIB8C) kapcsolódik.