LymphoTrack® Dx Assays

Gebrauchsanweisung

CE UKCA IVD

LymphoTrack® Dx Software – MiSeq™ Version 2.4.6

Diese Software wird gemeinsam mit jedem LymphoTrack Dx Assay für das Illumina MiSeq-Instrument zur Analyse von FASTQ -Rohdateien bereitgestellt. Die Software setzt sich aus drei Teilen zusammen: der LymphoTrack Datenanalyseanwendung und Reporteranwendung, einem LymphoTrack Reporter-Plugin, das automatisch nach der Analyse ausgeführt wird, sowie einem optionalen LymphoTrack-Visualisierungsverfahren, das aus vier Microsoft Excel-Tabellen im Format XLSM besteht. Die Software kann auf allen unterstützten Microsoft Windows®-Plattformen ausgeführt werden.

Diese Software ermöglicht die Klonalitätsanalyse einzelner oder mehrerer Zieldaten (*IGHV* Leader [„Leader“], *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* oder *TRG*) und stellt außerdem den somatischen Hypermutationsstatus von mit Leader- oder *IGH*-FR1-Assays ausgeführten Proben bereit.

IVD Zur Verwendung als *In-Vitro*-Diagnostikum.

Produktkompatibilität

Diese LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009) wurde eigens für die folgenden Invivoscribe-Assays entwickelt und ist **ausschließlich** mit den folgenden Invivoscribe-Assays kompatibel:

Katalognummer		Beschreibung	UDI
REF	91210059	LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay Kit A – MiSeq	00850052003814
REF	91210069	LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Somatic Hypermutation Assay Panel – MiSeq	00850052003821
REF	91210009	LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay Kit A – MiSeq	00850052003647
REF	91210039	LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay Panel – MiSeq	00850052003654
REF	91210089	LymphoTrack Dx *IGH* FR2 Assay Kit A – MiSeq	00850052003838
REF	91210099	LymphoTrack Dx *IGH* FR2 Assay Panel – MiSeq	00850052003845
REF	91210109	LymphoTrack Dx *IGH* FR3 Assay Kit A – MiSeq	00850052003852
REF	91210119	LymphoTrack Dx *IGH* FR3 Assay Panel – MiSeq	00850052003869
REF	91210129	LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay Kit A – MiSeq	00850052003876
REF	91210139	LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay Panel – MiSeq	00850052003883
REF	91220009	LymphoTrack Dx *IGK* Assay Kit A – MiSeq	00850052003906
REF	91220019	LymphoTrack Dx *IGK* Assay Panel – MiSeq	00850052003913
REF	92270019	LymphoTrack Dx *TRG* Kit A – MiSeq	00850052003678
REF	92270009	LymphoTrack Dx *TRG* Panel – MiSeq	00850052003661
REF	92250009	LymphoTrack Dx *TRB* Kit A – MiSeq	00850052003937
REF	92250019	LymphoTrack Dx *TRB* Panel – MiSeq	00850052003944

invivoscribe

Inhalt

1. Verwendungszweck 3
2. Glossar und Abkürzungen 3
3. Mindestsystemanforderungen 4
4. Warn- und Vorsichtshinweise 4
5. Softwareinstallation 5
6. Ausführen der Datenanalysesoftware 5
7. Datenvisualisierung mit dem LymphoTrack Reporter (automatisch, empfohlen) 10
8. Datenvisualisierung (Manuell): Ausführen der Excel Datenvisualisierungstabellen – nicht empfohlen 11
9. Technischer Support und Kundendienst 14
10. Symbole 14
11. Haftungshinweis 15
12. Software – Häufig gestellte Fragen 15

1. Verwendungszweck

Die LymphoTrack Dx Software – MiSeq ist für die Analyse von Bioinformatik-Daten sowie die visuelle Darstellung von FASTQ Rohdateien des Illumina MiSeq Instruments bei der Verwendung mit LymphoTrack Dx Assays vorgesehen.

2. Glossar und Abkürzungen

2.1. Glossar

Tabelle 1. Glossarbegriffe

Begriff	Definition
Klonal	Die Ansammlung genetisch identischer Zellen oder Organismen, die aus einer einzigen Vorläuferzelle hervorgegangen sind.
Ungültig	Eine Probe- oder Kontrollergebnis, das die Gültigkeitskriterien nicht erfüllt.
Semantic Versioning	Ein Softwareversionsschema bestehend aus 3 Nummern (Major.Minor.Patch), abgestimmt auf den Risikofaktor des Updates.
Software	LymphoTrack Dx Software - MiSeq
System	Das gesamte Paket aus Software, Hardware und Test (sofern zutreffend), aus dem das medizinische Gerät besteht.

2.2. Abzürzungen

Tabelle 2. Abkürzungen definiert

Abkürzung	Definition
CDR3	Komplementaritätsbestimmende Region, die durch die Verbindung von V-(D)-J-Segmenten entsteht und die Diversität der zellulären Immunreaktion festlegt
CSV	Format mit Komma-getrennten Werten
FASTQ	Ein textbasiertes Format zum Speichern sowohl einer biologischen Sequenz (normalerweise Nukleotidsequenz) als auch der entsprechenden Qualitätsbewertungen
FFPE	Formalinfixierte und paraffin-eingebettet
IFU	Gebrauchseinweisungen
IGH FR1	Schweren Immunglobulinkette Framework-Region 1
IGH FR2	Schweren Immunglobulinkette Framework-Region 2
IGH FR3	Schweren Immunglobulinkette Framework-Region 3
IGHV	Variablen Region der Schweren Immunglobulinkette
IGK	Immunglobulin-Kappa-Leichtkette
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDF	Portables Dokumentenformat
SHM	Somatischen Hypermutation
TRB	T-Zell-Rezeptor-Beta
TRG	T-Zell-Rezeptor-Gamma
TSV	Format mit Tabulator-getrennten Werten
USB	Universeller Serieller Bus; ermöglicht den Datenaustausch und die Stromversorgung zwischen vielen verschiedenen Arten von Elektronik

3. Mindestsystemanforderungen

- **Prozessor:** Intel Core 2 Duo oder neuere CPU empfohlen.
- **Festplatte:** Mindestens 80 GB freier Speicherplatz auf der Festplatte ist erforderlich; 250 GB wird empfohlen.
- **RAM:** 4 GB ist erforderlich; 8 GB oder mehr wird empfohlen.
- **Betriebssystem:** Windows 10 Pro oder Windows 11 Pro (64 Bit) ist erforderlich.
- Ein PDF-Reader, beispielsweise der Adobe Acrobat Reader, wird für die visuelle Darstellung der von LymphoTrack Reporter generierten Berichte benötigt.
- Microsoft Office Excel 2007, 2010 oder 2013 mit aktivierter Makro-Unterstützung ist für die visuelle Darstellung erforderlich.
- CD-ROM-Laufwerk.
- Die LymphoTrack Dx Software – MiSeq v2.4.6 wurde für die Verwendung unter Windows 10 Pro und Windows 11 Pro, konfiguriert für Englisch (USA) mit Standardanzeigeeinstellungen und Standardbildschirmgröße sowie für Microsoft Excel 2007/2010/2013 als Alternative für die Datenvisualisierung validiert. Die Verwendung anderer Windows-/Excel-Versionen und/oder Sprach-/Anzeigeeinstellungen kann unter Umständen zu Kompatibilitätsproblemen führen.

4. Warn- und Vorsichtshinweise

- **Standardbildschirmgröße**. Die optimale Bildschirmauflösung für die LymphoTrack Dx Software – MiSeq beträgt 100 %. Das Einstellen der Standardgröße des Bildschirms auf mehr als 100 % kann die Anzeige des Feldtexts in der Benutzeroberfläche beeinflussen.
- **Systemschriftart**. Die Benutzeroberfläche wurde so gestaltet, dass die Standardschriftarteinstellungen des Systems auf einem Windows-Computer mit der Spracheinstellung Englisch (USA) verwendet werden. Eine Änderung der Systemschriftart oder die Nutzung einer anderen Systemsprache als Englisch (USA) kann sich unter Umständen auf den angezeigten Feldtext in der Benutzeroberfläche auswirken.
- **Kompatible Dateien.** Die LymphoTrack Dx Software – MiSeq ist mit FASTQ.GZ -Dateien kompatibel, die von der MiSeq Reporter-Software generiert werden. Die LymphoTrack Dx Software – MiSeq ist nicht mit FASTQ.GZ -Dateien kompatibel, die von der *Bcl2fastq*-Software generiert werden.
- **Adapter Trimming (Adapter-Trimming).** Adapter Trimming (Adapter-Trimming) muss bei der ☑ Erstellung von MiSeq-Probenblättern aktiviert sein, damit Adapter-Trimming bei den resultierenden FASTQ.GZ -Dateien durchgeführt wird.
- **Energiesparmodus und Ruhezustand.** Ziehen Sie vor der Ausführung der LymphoTrack Dx Datenanalyseanwendung eine Deaktivierung des Energiesparmodus und/oder des Energiesparmodus oder Ruhezustands in Betracht. Wenn der Computer in den Energiesparmodus oder Ruhezustand wechselt, wird die Software möglicherweise angehalten.
- **Zeichen im Pfad- und Dateinamen.** 1) Vermeiden Sie Leerzeichen im Pfadnamen für Datendateien oder Software (zu diesen Pfadnamen gehören die Namen von Dateiordnern und Dateien) und mehr als ein Leerzeichen in unmittelbarer Folge ist nicht gestattet. 2) Es ist wichtig, dass Dateinamen lediglich alphanumerische Zeichen und Bindestriche enthalten (A–Z, a–z, 0–9, - [Bindestrich]). Sollte die Software auf ein Zeichen stoßen, das nicht in dieser Liste aufgeführt wird, wird sie möglicherweise angehalten. Stellen Sie sicher, dass Sie bei der Erstellung des Probenblatts für MiSeq dieser Proben-Nomenklatur folgen. 3) Pfadnamen dürfen nicht länger als 255 Zeichen sein. Probennamen, für die der Name der Ausgabedatei an diesen Grenzwert heranreicht, können nur schwer in andere Ordner kopiert werden.
- **Probenduplikate müssen einen eindeutigen, unverwechselbaren Probennamen aufweisen.** Geben Sie jeder Probe bei deren Benennung einen eindeutigen Namen und eine eindeutige Kennzeichnung. Wenn Proben doppelt ausgeführt werden, können sie „Probe1a“ und „Probe1b“ benannt werden. Wenn mehrere Proben, die gemeinsam in der gleichen Flusszelle verarbeitet werden, nicht über eindeutige Namen verfügen, wird nur eine Probe während des Analyseverfahrens von der Software analysiert.

5. Softwareinstallation

5.1. Doppelklick auf ***LymphoTrackDxMiSeq-2.4.6.IVD.msi*** welches sich auf der Software CD befindet und folgen Sie den Anweisungen auf dem Bildschirm.

- Die Software darf nur auf einer lokalen Festplatte installiert werden, nicht auf einem Netzlaufwerk.
- Wird die Software über eine Netzwerkverbindung ausgeführt, funktioniert sie möglicherweise nicht ordnungsgemäß.

6. Ausführen der Datenanalysesoftware

6.1. Identifizieren Sie die zu analysierenden Adapter-Trimming-FASTQ.GZ -Dateien mit gepaartem Ende. Diese Dateien befinden sich im ausgeführten MiSeq-Ordner. Sie sind die FASTQ.GZ -Dateien, die als Eingabe für die **LymphoTrackDxMiSeq** Datenanalyseanwendung verwendet werden.

- Die *Undetermined_*.fastq.gz*-Dateien werden nicht für die Analyse benötigt.

6.2. Kopieren Sie die oben aufgeführten FASTQ.GZ-Dateien in einen leeren Ordner auf dem Computer. Laden Sie diese Dateien auf denselben lokalen Computer herunter, auf dem auch die LymphoTrack Dx Software installiert ist.

- Die Festplatte, auf der sich der Ordner befindet, muss mindestens 80 GB verfügbaren Speicherplatz aufweisen.
- Dieser Ordner wird nun zum **<input_folder>** (**<Eingabeordner>**) der Software, auf den wir uns weiter unten beziehen.

6.3. Doppelklicken Sie auf die Anwendungsdatei ***LymphoTrackDxMiSeq-2.4.6.IVD*** die sich im **Invivoscribe** Ordner befindet, der während der Installation erstellt wurde.

- Der Standardspeicherort ist *Lokaler Datenträger (C:) > Invivoscribe*.

6.4. Lesen Sie die Lizenzvereinbarung. Wenn Sie die Bedingungen akzeptieren möchten, klicken Sie auf **Accept** (**Akzeptieren**), um fortzufahren.

6.5. Markieren Sie unter *Choose analysis mode(s) (Analysemodus wählen)* das Kontrollkästchen mit dem gewünschten Analysemodus.

- Der Analysemodus muss dem Datentyp im Lauf entsprechen (Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* und/oder *TRG*).

6.6. Wählen Sie unter *Choose decimal mark (Dezimaltrennzeichen wählen)* das gewünschte Dezimaltrennzeichen aus.

- Hierbei handelt es sich um eine Pflichteingabe, die später Auswirkungen auf die visuelle Darstellung der Daten durch das Microsoft Excel-Makro hat.
- Sie können als Dezimaltrennzeichen den Punkt („.“) oder das Komma („,“) auswählen.

ACHTUNG! **Dezimaltrennzeichen.** Um zu bestimmen, welche Option Sie auswählen müssen, öffnen Sie eine neue Excel-Tabelle und geben **=10000** in Zelle A1 ein. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Zelle und wählen Sie **Format Cells (Zellen formatieren)**.

- ☐ Wählen Sie auf der Registerkarte *Number (Zahl)* in der Liste *Category (Kategorie):* die Option **Number (Zahl)**. Rechts befindet sich der Wert für *Decimal places (Dezimalstellen)*, der auf **2** festgelegt ist.
- ☐ Unterhalb dieses Werts befindet sich das Kontrollkästchen *Use 1000 Separator* (*1000er-Trennzeichen verwenden*). Aktivieren Sie dieses Kästchen und betrachten Sie die Probennummer darüber. Sie enthält die ursprünglich eingegebene Zahl, die nach den Excel-Standardeinstellungen als Zahl mit Dezimaltrennzeichen formatiert wurde.
- ☐ Sollte sie das Format *‚10,000.00‘* aufweisen, müssen Sie als Dezimaltrennzeichen die Option **decimal point (Dezimalpunkt)** auswählen. Sollte sie das Format *„10.000,00*“ aufweisen, müssen Sie als Dezimaltrennzeichen die Option **decimal comma (Dezimalkomma)** auswählen.

6.7. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Browse (Durchsuchen)**, um einen Eingabeordner auszuwählen. Hierbei handelt es sich um den oben angegebenen <input_folder>, der die zu analysierenden Dateien enthält. Bei Auswahl des Eingabeordners sieht es so aus, als sei dieser leer.

ACHTUNG! **Der ausgewählte <input_folder> (<Eingabeordner>) darf keine Dateien mit demselben Namen wie der Eingabeordner enthalten**. Wenn das Programm mit einer Probe ausgeführt wird, die denselben Dateinamen hat wie der Ordner, der als Eingabe für die Analysefunktion angegeben wurde, kommt es zu einem Fehler und die Analyselaufzeit verlängert sich erheblich (d.h. die Verarbeitung einer kleinen Probe kann anstatt weniger Sekunden bis zu 30 Minuten in Anspruch nehmen).

6.8. Nachdem Sie den **<input_folder>** und den Analysemodus ausgewählt haben, klicken Sie auf die Schaltfläche **Launch Program (Programm starten)**.

ACHTUNG! **Der ausgewählte <input_folder> darf nur Dateien mit dem Format FASTQ oder FASTQ.GZ enthalten.** Sollte weder ein Dateityp noch eine Mischung verschiedener Dateitypen im Ordner enthalten sein, gibt das Programm eine Fehlermeldung aus und fordert dazu auf, einen anderen Ordner auszuwählen. Wenn die FASTQ-Dateien von *Bcl2fastq* (die Dateinamen enthalten die Barcodesequenz anstelle der Nomenklatur „S1, S2, S3“ etc...) generiert wurden, gibt das Programm eine Fehlermeldung aus und fordert dazu auf, die Daten mit der MiSeq Reporter-Software erneut zu analysieren.

6.9. **Analysestatus**. Nachdem Sie auf **Launch Program** (**Programm starten**) geklickt haben, wird im Hauptfenster der Programmstatus angezeigt. Wenn das Programm die Analyse der Eingabedatendateien abgeschlossen hat, werden im Hauptprogrammfenster die Nachricht *Analysis is complete… (Analyse abgeschlossen...)* und der Speicherpfad des Ausgabeordners angezeigt. Außerdem erscheint die Aufforderung, die entsprechende Excel-Tabelle mit der Data Visualization (Datenvisualisierung) zu öffnen. Über das Hauptfenster des Programms können Sie sofort nach Abschluss einer Analyse eine neue Analyse starten.

ACHTUNG! **Analysedauer.** Die Dauer des Programmdurchlaufs ist abhängig von der Größe und Anzahl der analysierten Proben, dem Analysemodus und der Computerhardware. Eine typische Verteilung der Lesevorgänge für einen 24-Proben-Assay beträgt 200.000 bis 1 Million Lesevorgänge pro Probe. Diese Zahl kann sich bei zukünftigen Versionen der MiSeq-Plattform ändern.

Die Analyse einer typischen mit *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* oder *TRG* untersuchten einzelnen Probe dauert etwa 1 bis 2 Minuten. Die Analyse eines typischen 24-Proben-Assays (nur Leader, nur *IGH* FR1, nur *IGH* FR2, nur *IGH* FR3, nur *IGK*, nur *TRB* oder nur *TRG*) dauert etwa 25 bis 50 Minuten. Werden typische 24-Proben-Assays einer Kombination aus Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* und/oder *TRG* untersucht, muss die Analysedauer mit der Anzahl der zu analysierenden Ziele multipliziert werden.

6.10. **Ausgabeordner.** Abhängig vom gewählten Analysemodus werden im **<input_folder>** ein oder mehrere Ausgabeordner erstellt, die die FASTQ - oder FASTQ.GZ -Dateien enthalten.

- Tabelle 3 erläutert die Beziehung zwischen dem Analysemodus und dem Namen der Ausgabeordner.

Tabelle 3. Ausgabeordner-Name gemäß Analysemodus.

Analysemodus	Ausgabeordner-Name(n)
Leader	LEADER_output (LEADER_Ausgabe)
IGH FR1	IGH_FR1_output (IGH_FR1_Ausgabe)
IGH FR2	IGH_FR2_output (IGH_FR2_Ausgabe)
IGH FR3	IGH_FR3_output (IGH_FR3_Ausgabe)
TRB	TRB_output (TRB_Ausgabe)
TRG	TRG_output (TRG_Ausgabe)
IGK	IGK_output (IGK_Ausgabe)
Beliebige Kombination aus: Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* und *TRG*	Zwei bis fünf der oben aufgeführten Ausgabeordner

6.11. Nach einer erfolgreichen Analyse durch das Programm enthält der Ausgabeordner pro analysierter Probe mehrere TSV -Dateien und eine PDF -Datei.

- Beachten Sie, dass in der unten aufgeführten Tabelle ein "*" für den in das Probenblatt eingegebenen Probennamen, gefolgt von der plattformspezifischen Nummer, steht (*z. B. samplename_S1_L001_001_combined*).
- Für die Analyse von Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *TRB* und *IGK* finden Sie in Tabelle 4 Beschreibungen der neun für jede Probe erzeugten Dateien.

Tabelle 4. Beschreibung der *IGH*-, *TRB*- und *IGK*-Ausgabedateien.

Analyse von Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *TRB* und *IGK*	
**.fastq_read_summary.tsv* *(*.fastq_Lesevorgangszusammenfassung.tsv)*	Enthält eine Liste der 200 häufigsten einmaligen Sequenzen, sortiert nach Anzahl (Zahl der Lesevorgänge), mit folgenden Angaben: ▪ Welches V-J-Rekombinationsereignis am besten mit der Sequenz übereinstimmt ▪ Länge ▪ Tatsächlicher prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge ▪ Kumulativer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge ▪ Wie genau der Lesevorgang das identifizierte V-Zielgen der Primer abdeckt (%) (*IGH/IGK* und *TRB*) ▪ Putative CDR3-Sequenz Leader und *IGH* FR1 umfassen zudem: ▪ Mutationsrate des partiellen V-Gens (%) Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3 umfassen zudem: ▪ Ob die Umlagerung voraussichtlich im Leseraster (In-Frame) liegt [Y/N/n/a (Ja/nein/keine Angabe)]. Wenn die Nutzung des V- oder J-Gensegments infolge der Qualität des Alignments nicht vorhergesagt werden kann, dann kann die Software nicht vorhersagen, ob sich das Gen im Leseraster (In-Frame) befindet, und das Ergebnis lautet *n/a (keine Angabe)*. ▪ Ob angenommen wird, dass die Umlagerung kein Stoppcodon enthält [Y/N (Ja/nein)]. Wenn eine In-Frame Vorhersage nicht möglich ist, kann nicht abgeschätzt werden, ob ein Stoppcodon vorhanden ist.
**.fastq_read_summary_merged_top10_search top500.tsv* *(*.fastq_Lesevorgangszusammenfassung_verknüpft _top10_ top500durchsuchen.tsv)*	Gleiches Format wie die Datei *read_summary (Lesevorgangszusammenfassung)*, enthält jedoch nur die 10 häufigsten Lesevorgänge der Datei *read_summary (Lesevorgangszusammenfassung)* verknüpft mit den 500 häufigsten Lesevorgängen. Ein Lesevorgang wird mit einem anderen zusammengelegt, wenn sich nur 1 oder 2 Nukleotide (nts) voneinander unterscheiden, wobei der Lesevorgang mit der höchsten Anzahl seine Sequenz-Identität beibehält und der Lesevorgang mit der geringeren Anzahl zu dem mit der höheren Anzahl addiert wird.
**.fastq_unique_reads.tsv* *(*.fastq_einmalige_Lesevorgänge.tsv)*	Eine FASTA-Datei einmaliger Sequenzen, sortiert nach deren Anzahl.
**.fastq_CDR3_unique_reads.tsv* *(*.fastq_CDR3_einmalige_Lesevorgänge.tsv)*	Eine FASTA-Datei der putativen CDR3-Sequenzen, die in der Datei FASTQ_UNIQUIE_READS (FASTQ_EINMALIGE_LESEVORGÄNGE) gefunden wurden.
**.fastq_VJ_sequence_frequency_family.tsv* *(*.fastq_VJ_Sequenzhäufigkeitsfamilie.tsv)*	Bei jeder Familie handelt es sich um eine Gruppe aller möglichen Rekombinationen, die in einer bestimmten V- oder J-Region gefunden wurden, beispielsweise eine V_1-Familie oder eine J_4-Familie. Innerhalb der V_1-Familie lässt sich jede Anzahl an Rekombinationen finden, wie beispielsweise $V_{1\text{-}69}$ und $V_{1\text{-}8}$. Diese Datei enthält eine Liste aller möglichen Rekombinationen der V-Familie – J-Familie, von denen jede über eine sortierte Liste der Lesevorgänge (höchster bis geringster prozentualer Anteil) verfügt. Diese Datei wird am besten in einem *Stapeldiagramm* in Excel verwendet.

Tabelle 4. Beschreibung der *IGH*-, *TRB*- und *IGK*-Ausgabedateien.

Analyse von Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *TRB* und *IGK*	
**.fastq_read_summary_family.tsv* *(*.fastq_Lesevorgangszusammen-fassungsfamilie.tsv)*	Enthält eine sortierte Liste einmaliger Sequenzen, geordnet nach Anzahl, die folgende Angaben enthält: ▪ Welches Rekombinationsereignis der V-J--Familie am besten mit der Sequenz übereinstimmt ▪ Länge ▪ Tatsächlicher prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge ▪ Kumulativer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge ▪ Wie genau der Lesevorgang das identifizierte V-Zielgen der Primer abdeckt (%)(*IGH/IGK*) ▪ Putative CDR3-Sequenz
**.fastq_read_summary_family.tsv* *(*.fastq_Lesevorgangszusammen-fassungsfamilie.tsv)*	Leader und *IGH* FR1 umfassen zudem: ▪ Mutationsrate des partiellen V-Gens (%) Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3 umfassen zudem: ▪ Ob die Umlagerung voraussichtlich im Leseraster (In-Frame) liegt [Y/N/n/a (Ja/nein/keine Angabe)]. ▪ Ob angenommen wird, dass die Umlagerung kein Stoppcodon enthält [Y/N (Ja/nein)].
**.fastq_VJ_usage_family.tsv* *(*.fastq_VJ_Nutzungsfamilie.tsv)*	Eine Zählungsmatrix und Matrix der prozentualen Anteile der verschiedenen Rekombinationsereignisse der V-Familie – J-Familie.
**<timestamp>.pdf* *(*<Zeitstempel>.pdf)*	Der von LymphoTrack Reporter generierte PDF -Bericht enthält ähnliche Informationen wie die Datei *Merged Read Summary (zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung)*, die Datei *Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)*, die Grafik *V – J usage (V – J-Nutzung)* und die Grafik *V – J sequence frequency (V – J-Sequenzhäufigkeit)*. Weitere Informationen hierzu finden Sie in Abschnitt 3 *Datenvisualisierung mit dem LymphoTrack Reporter (automatisch, empfohlen)*.
**.fastq_VJ_usage.tsv* *(*.fastq_VJ_Nutzung.tsv)*	Eine Zählungsmatrix und Matrix der prozentualen Anteile der verschiedenen V-J-Rekombinationsereignisse.

Hinweis: Die *IGK*-Analyse umfasst zusätzliche Informationen zu weiteren Elementen im *IGK*-Locus, die an Rekombinationen beteiligt sind (IGKINTR und IGKDEL).

Hinweis: Die *TRB*-Analyse umfasst zusätzliche Informationen zu weiteren Elementen im *TRB*-Locus, die an Rekombinationen der D – J-Region beteiligt sind.

Hinweis: Die *‚Putative CDR3-Sequence' (Putative CDR3-Sequenz)* wird bestimmt, indem ein Abgleich mit der genauen Definition einer CDR3-Sequenz stattfindet. Eine Mutation von Ankerpunkten oder eine Unterbrechung des Leserasters führt zur Ausgabe des Ergebnisses *‚not found' (nicht gefunden).*

- Für die *TRG*-Analyse finden Sie in Tabelle 5 Beschreibungen der sieben für jede Probe erzeugten Dateien.

Tabelle 5. Beschreibung der *TRG*-Ausgabedateien.

***TRG*-Analyse**	
**.fastq_read_summary.tsv* *(*.fastq_Lesevorgangszusammenfassung.tsv)*	Eine sortierte Liste einmaliger Sequenzen, geordnet nach Anzahl, die folgende Angaben enthält: ▪ Welches V-J-Rekombinationsereignis am besten mit der Sequenz übereinstimmt ▪ Länge ▪ Tatsächlicher prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge ▪ Kumulativer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Reads ▪ Putative CDR3 sequence (Putative CDR3-Sequenz)

Tabelle 5. Beschreibung der *TRG*-Ausgabedateien.

***TRG*-Analyse**	
**.fastq_read_summary_merged_top10_searchtop500.tsv (*.fastq_zusammengelegte_Lesevorgangszusammenfassung_top10) (Suchetop500.tsv)*	Gleiches Format wie die Datei *read_summary (Lesevorgangszusammenfassung)*, enthält jedoch nur die 10 häufigsten Lesevorgänge der *(Lesevorgangszusammenfassung)* verknüpft mit den 500 häufigsten Lesevorgängen. Ein Lesevorgang wird mit einem anderen zusammengelegt, wenn sich nur 1 oder 2 nts voneinander unterscheiden, wobei der Lesevorgang mit der höheren Anzahl seine Sequenz-Identität beibehält und der Lesevorgang mit der geringeren Anzahl zu dem mit der höheren Anzahl addiert wird.
**.fastq_unique_reads.tsv (*.fastq_einmalige_Lesevorgänge.tsv)*	Eine FASTA-Datei einmaliger Sequenzen, sortiert nach deren Anzahl.
**.fastq_CDR3_unique_reads.tsv (*.fastq_CDR3_einmalige_Lesevorgänge.tsv)*	Eine FASTA-Datei der putativen CDR3-Sequenzen, die in der Datei FASTQ_UNIQUIE_READS (FASTQ_EINMALIGE_LESEVORGÄNGE) gefunden wurden.
**.fastq_VJ_sequence_frequency.tsv (*.fastq_VJ_Sequenzhäufigkeit.tsv)*	Eine Liste aller möglichen V-J-Rekombinationen, von denen jede über eine sortierte Liste der Lesevorgänge (höchster bis geringster prozentualer Anteil) verfügt. Die erste Zahl muss dem Prozentsatz (%) der Gesamtlesevorgänge entsprechen, den der erste einmalige Lesevorgang von allen sequenzierten Lesevorgängen berücksichtigt hat. Diese Datei wird am besten in einem „Stapeldiagramm“ in Excel verwendet.
**.fastq_VJ_usage.tsv (*.fastq_VJ_Nutzung.tsv)*	Eine Zählungsmatrix und Matrix der prozentualen Anteile der verschiedenen V-J-Rekombinationsereignisse.
**<timestamp>.pdf (*<Zeitstempel>.pdf)*	Der vom LymphoTrack Reporter generierte PDF-Bericht enthält ähnliche Informationen wie die Datei *Merged Read Summary (zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung)*, die Datei *Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)*, die Grafik *V – J usage (V – J-Nutzung)* und die Grafik *V – J sequence frequency (V – J-Sequenzhäufigkeit)*. Weitere Informationen hierzu finden Sie in Abschnitt 3 *Datenvisualisierung mit dem LymphoTrack Reporter (automatisch, empfohlen)*.

Hinweis: Die *Putative CDR3-Sequence (Putative CDR3-Sequenz)* wird bestimmt, indem ein Abgleich mit der genauen Definition einer CDR3-Sequenz stattfindet. Eine Mutation von Ankerpunkten oder eine Unterbrechung des Leserasters führt zur Ausgabe des Ergebnisses *not found (nicht gefunden)*.

- Die Ausgabeordner enthalten PDF -Berichte und TSV-Ausgabe-Datendateien.
- Die TSV Dateien können als Eingabedateien für die Datenvisualisierungstabellen genutzt werden.

7. Datenvisualisierung mit dem LymphoTrack Reporter (automatisch, empfohlen)

7.1. Bei Abschluss der Analyse wird automatisch ein PDF -Bericht für jede Probe erstellt.

- Der Bericht ist nach dem Probennamen im Probenblatt benannt, gefolgt von plattformspezifischen Daten, und endet mit einem Zeitstempel (TTMMJJhhmmss).

ACHTUNG! **Beim Speichern des PDF -Berichts ist Folgendes zu beachten:** Je nach dem zum Öffnen der PDF verwendeten Programm können ein oder mehrere Spalten bearbeitet werden. An der PDF dürfen KEINE Änderungen vorgenommen werden. Wenn der Benutzer vermutet, dass eine Bearbeitung erfolgt ist, darf die PDF NICHT gespeichert werden. Wenn der Benutzer vermutet, dass eine geänderte PDF -Datei gespeichert wurde, muss er die Analyse erneut ausführen, um einen neuen PDF -Bericht zu erstellen.

7.2. Die erste Seite des PDF Berichts enthält einen ***Index Q30***-Wert. Dieser Wert wird als der Prozentsatz der Basen berechnet, die einen Qualitätswert von 30 oder höher aufweisen, jedoch nur von Lesevorgängen, die nach dem Trimming einem Index zugeordnet wurden. Dieser Wert kann herangezogen werden, um festzustellen, ob der Index die Standard-Illumina-Spezifikation erfüllt.

- In manchen Fällen unterschätzt der vom Sequenzer bereitgestellte Q30-Wert die Qualität eines Laufs, da unbestimmte Sequenzen und ungetrimmte Regionen auf den Q30-Wert angerechnet werden.
- Unbestimmte und ungetrimmte Regionen sind gewöhnlich von geringerer Qualität und tragen nicht zur weiteren Analyse durch LymphoTrack bei.

7.3. Die erste Seite des PDF -Berichts enthält eine Tabelle der Ergebnisse der ***Merged Read Summary (zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung)***, gefolgt von den grafischen Darstellungen der Ergebnisse der ***V – J Sequence Frequency (V – J-Frequenzhäufigkeit)*** und ***V – J Usage (V – J-Nutzung)***, und die restlichen Seiten enthalten eine Tabelle der Ergebnisse der nicht zusammengelegten ***Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)***.

- Ihre Inhalte sind in Tabelle 6 aufgeführt:

Tabelle 6. Beschreibung des Inhalts des PDF -Berichts.

PDF-Ausgabe für LymphoTrack Reporter	

Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)	Enthält eine sortierte Liste der 200 häufigsten einzigartigen Sequenzen, geordnet nach Anzahl, die folgende Angaben enthält:
	• Welches V-J-Rekombinationsereignis am besten mit der Sequenz übereinstimmt
	  ○ Sequenz
	  ○ Sequenzlänge
	  ○ Tatsächlicher prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge
	• Kumulativer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge für die 200 häufigsten Lesevorgänge
	  ○ Wie genau der Lesevorgang das identifizierte V-Zielgen der Primer abdeckt (%). (IGH/IGK)
	  ○ Putative CDR3-Sequenz
	Leader und *IGH* FR1 umfassen zudem:
	• Mutationsrate des partiellen V-Gens (%)
	Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3 umfassen zudem:
	• Ob die Umlagerung voraussichtlich im Leseraster (In-Frame) liegt [Y/N/n/a (Ja/nein/keine Angabe)]. Wenn die Nutzung des V- oder J-Gensegments infolge der Qualität des Alignments nicht vorhergesagt werden kann, dann kann die Software nicht vorhersagen, ob sich das Gen im Leseraster (In-Frame) befindet, und das Ergebnis lautet *n/a (keine Angabe)*.
	• Ob angenommen wird, dass die Umlagerung kein Stoppcodon enthält [Y/N (Ja/nein)]. Wenn eine In-Frame Vorhersage nicht möglich ist, kann nicht abgeschätzt werden, ob ein Stoppcodon vorhanden ist.

Tabelle 6. Beschreibung des Inhalts des PDF -Berichts.

PDF-Ausgabe für LymphoTrack Reporter	
Merged Read Summary (Zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung)	Gleiches Format wie die Tabelle der Lesevorgangszusammenfassung, umfasst jedoch nur die 10 häufigsten Lesevorgänge nach einer Zusammenlegung mit den 500 häufigsten, wenn die Lesevorgänge nur 1 oder 2 nts Unterschied aufweisen. Außerdem wird der Index-Q30-Wert unter *Total Read Count (Anzahl der Gesamtlesevorgänge)* angezeigt.
Grafik „V – J Sequence Frequency" (V – J-Sequenzhäufigkeit)	Ein Histogramm zeigt die 200 häufigsten Sequenzen jeder Rekombination von V-Familie – J-Familie (für *IGH*/*IGK* und *TRB*) oder V-Gen – J-Gen (für *TRG*).
Grafik „V – J Usage" (V – J-Nutzung)	Ein 3D-Balkendiagramm zeigt die Nutzung der V-Familien/J-Familien der 200 häufigsten Sequenzen (für *IGH*/*IGK* und *TRB*) oder der V-Gen-/J-Gen-Nutzung aller Sequenzen (für *TRG*).

Hinweis: Die *Putative CDR3 sequence (Putative CDR3-Sequenz)* wird bestimmt, indem ein Abgleich mit der genauen Definition einer CDR3-Sequenz stattfindet. Eine Mutation von Ankerpunkten oder eine Unterbrechung des Leserasters führt zur Ausgabe des Ergebnisses „not found" (nicht gefunden).

Hinweis: Die *IGK*-Analyse umfasst zusätzliche Informationen zu weiteren Elementen im *IGK*-Locus, die an Rekombinationen beteiligt sind (IGKINTR und IGKDEL).

Hinweis: Die *TRB*-Analyse umfasst zusätzliche Informationen zu weiteren Elementen im *TRB*-Locus, die an Rekombinationen der D – J-Region beteiligt sind.

8. Datenvisualisierung (Manuell): Ausführen der Excel Datenvisualisierung-stabellen – nicht empfohlen

8.1. Prüfen Sie die Sicherheitseinstellungen in Microsoft Excel, um sicherzustellen, dass Makros aktiviert sind:

8.1.1. Excel 2007: Klicken Sie auf die Schaltfläche **Office** und wählen Sie **Excel Options** (**Excel-Optionen**) aus.
8.1.2. Excel 2010/2013: Klicken Sie auf das Menü **File** (Datei) und wählen Sie **Options** (**Optionen**) aus.
8.1.3. Klicken Sie im Fenster *Options* (*Optionen*) auf **Trust Center** und klicken Sie auf die Schaltfläche **Trust Center Settings...** (**Trust Center Einstellungen...**).
8.1.4. Klicken Sie auf **Macro Settings** (**Makroeinstellungen**) und wählen Sie die Option *Disable all macros* with notification (*Alle Makros mit Benachrichtigung deaktivieren*) aus.
8.1.5. Klicken Sie auf **OK** und anschließend erneut auf **OK**.
8.1.6. Schließen Sie Excel.

ACHTUNG! Da die Visualisierungsdateien als Arbeitsmappe gespeichert werden können (was die Funktionsfähigkeit des Makros beeinträchtigen würde), kopieren Sie die Visualisierungsdateien in einen anderen Dateipfad, bevor Sie mit der Analyse beginnen.

8.2. Doppelklick auf das entsprechende *Data Visualization spreadsheet file*.

- Die Visualisierungsdateien befinden sich im Unterordner „visualizations" im Installationsordner der Software. Die folgenden Visualisierungstabellendateien sind verfügbar::
  - ☐ *LymphoTrackDxIGHVisualization.xlsm* für Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3
  - ☐ *LymphoTrackDxIGKVisualization.xlsm* für *IGK*
  - ☐ *LymphoTrackDxTRBVisualization.xlsm* für *TRB*
  - ☐ *LymphoTrackDxTRGVisualization.xlsm* für *TRG*

8.3. Beim Öffnen der Datei erscheint möglicherweise folgende Meldung: ***Security Warning – Macros have been disabled*** (***Sicherheitswarnung – Makros wurden deaktiviert***).

8.3.1. Excel 2007: Klicken Sie auf die Schaltfläche **Options**... (**Optionen...**) rechts neben der Warnung und wählen Sie **Enable this content** (**Diesen Inhalt aktivieren**). Klicken Sie anschließend auf **OK**.
8.3.2. Excel 2010/2013: Klicken Sie auf die Schaltfläche **Enable Content** (**Inhalt aktivieren**).

- Das Datenvisualisierungsmakro startet automatisch.

8.4. Die Lizenzvereinbarung wird eingeblendet und muss zugestimmt werden, um die Software verwenden zu können.

- Nachdem Sie die Lizenzvereinbarung akzeptiert haben, wird ein Dialogfeld mit der folgenden Aufforderung angezeigt: Please select the *Read Summary file for the sample you want. (Bitte die Datei Lesevorgangszusammenfassung für die gewünschte Probe wählen)*.
- Das Makro kann jeweils nur die Daten einer Probe auf einmal darstellen. Daher muss dieser Vorgang für alle Proben wiederholt werden, deren Daten visuell dargestellt werden sollen.

8.5. Durchsuchen Sie den von der Datenanalyseanwendung erstellten Ausgabeordner, der die darzustellenden Dateien enthält, und wählen Sie die Datei ***FASTQ_READ_SUMMARY (FASTQ_LESEVORGANGSZUSAMMENFASSUNG)*** für die Probe aus, die untersucht werden soll.

8.6. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Open (Öffnen)**.

- Das Makro lädt die Datendateien der ausgewählten Probe und erstellt mehrere Tabellen, die jeweils andere lesbare Ansichten der Daten enthalten.
- Dieser Vorgang nimmt einige Augenblicke in Anspruch; die Dauer ist abhängig von der Probengröße und der Computerhardware.

ACHTUNG! Aufgrund einer Einschränkung in Microsoft Excel kann die Visualisierungssoftware maximal 1.048.576 Datenzeilen pro Tabelle anzeigen. Falls Datenanalyse-Ausgabedateien für die aktuell ausgewählte Probe mehr Zeilen aufweisen, werden nur die ersten 1.048.576 Datenzeilen angezeigt.

Wenn diese maximale Anzahl erreicht wird, erscheint eine Warnmeldung, die darauf hinweist, welche Tabelle/n hiervon betroffen ist/sind. Klicken Sie zum Fortfahren auf **OK**.

Auch wenn nicht alle Daten angezeigt werden, sind die Grafiken nicht betroffen und sind korrekt.

ACHTUNG! Grafische Darstellungen werden für die Anzeigerichtung **Left-to-right** (**Links-nach-rechts**) generiert. In Ländern mit Leserichtung von rechts nach links sind die Excel-Standardeinstellungen möglicherweise nicht kompatibel und die grafischen Darstellungen werden nicht richtig generiert. Zur Lösung dieses Problems muss die Excel-Anzeigeoption in **Left-to-right** (**Links-nach-rechts**) geändert werden. Diese Option können Sie entweder über *Office > Excel Options (Office > Excel-Optionen)* in Excel 2007 oder *File > Options (Datei > Optionen)* in Excel 2010/2013 festlegen. Wählen Sie **Advanced (Erweitert)**, und scrollen Sie dann zu den Einstellungen für *Display (Anzeige)*. Ändern Sie die Option *Default direction (Standardrichtung)* in **Left-to-right** (**Links-nach-rechts**), und klicken Sie dann auf **OK**. Beim nächsten Öffnen von Excel werden die Tabellen von links nach rechts gelesen und die Visualisierungssoftware kann die Diagramme ordnungsgemäß erstellen.

Wenn diese Situation eintritt und Sie Fragen haben, wenden Sie sich unter der Nummer +1 (858) 224-6600 an den Technischen Support von Invivoscribe, der Ihnen montags bis freitags von 7:00 Uhr bis 17:00 Uhr PST/PDT (15:00 Uhr bis 1:00 Uhr MEZ) zur Verfügung steht. Alternativ erreichen Sie uns auch unter der E-Mail-Adresse support@invivoscribe.com.

8.6.1. Wird eine Nachricht über *Complex Formatting (Komplexe Formatierung)* angezeigt, klicken Sie auf **Yes** (**Ja**).

8.7. **Speichern Sie die Visualisierungsdatei.** Wenn die Verarbeitung abgeschlossen ist, weist eine Meldung darauf hin, dass das Programm abgeschlossen hat. Es wird dringend empfohlen, die Datei jetzt zu speichern.

ACHTUNG! Stellen Sie beim Speichern sicher, dass Sie die Option **Save as** (**Speichern unter**) und anschließend ein Excel-Arbeitsmappenformat (XSLX oder XLS) auswählen. Wenn sie auf **Save** (**Speichern**) oder das Diskettensymbol klicken, wird das XLSM -Makro durch die aktuelle Arbeitsmappe ersetzt. Dadurch müsste das Makro für nachfolgende Analysen durch eine neue Kopie von der Software-CD ersetzt und erneut installiert werden.

8.7.1. Wenn eine Warnmeldung bezüglich der Speicherung der Arbeitsmappe als makrofreies Dokument angezeigt wird, klicken Sie auf die Schaltfläche **Yes** (**Ja**).

8.8. Für Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* und *TRG* enthält die fertige Arbeitsmappe die in Tabelle 7 beschriebenen, folgenden acht Arbeitsblätter.

Tabelle 7. In der Excel-Ausgabedatei enthaltene Arbeitsblätter.

Vollständige Arbeitsmappe für Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* und *TRG*	
Merged Read Summary (Zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung)	Gleiches Format wie die Tabelle *Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)*, umfasst jedoch nur die 10 häufigsten Lesevorgänge nach einer Zusammenlegung mit den 500 häufigsten, wenn die Lesevorgänge nur 1 oder 2 nts Unterschied aufweisen.

Tabelle 7. In der Excel-Ausgabedatei enthaltene Arbeitsblätter.

Vollständige Arbeitsmappe für Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* und *TRG*	
Read Summary *(Lesevorgangszusammenfassung)*	Enthält eine sortierte Liste der 200 häufigsten einzigartigen Sequenzen, geordnet nach Anzahl, die folgende Angaben enthält: ▪ Welches V-J-Rekombinationsereignis am besten mit der Sequenz übereinstimmt ▪ Sequenz ▪ Sequenzlänge ▪ Tatsächlicher prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Reads ▪ Kumulativer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge für alle Lesevorgänge (nur *TRG*) ▪ Kumulativer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge für die 200 häufigsten Lesevorgänge (*IGH*/*IGK* und *TRB*) ▪ Wie genau der Lesevorgang das identifizierte V-Zielgen der Primer abdeckt (%) (*IGH*/*IGK*) ▪ Putative CDR3-Sequenz Leader und *IGH* FR1 umfassen zudem: ▪ Mutationsrate des partiellen V-Gens (%) Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3 umfassen zudem: ▪ Ob die Umlagerung voraussichtlich im Leseraster (In-Frame) liegt [Y/N/n/a (Ja/nein/keine Angabe)]. Wenn die Nutzung des V- oder J-Gensegments infolge der Qualität des Alignments nicht vorhergesagt werden kann, dann kann die Software nicht vorhersagen, ob sich das Gen im Leseraster (In-Frame) befindet, und das Ergebnis lautet n/a (keine Angabel). Ob angenommen wird, dass die Umlagerung kein Stoppcodon enthält [Y/N (Ja/nein)]. Wenn eine In-Frame Vorhersage nicht möglich ist, kann nicht abgeschätzt werden, ob ein Stoppcodon vorhanden ist. ▪ Putative CDR3-Sequenz
VJ Sequence Frequency *(VJ-Sequenzhäufigkeit)*	Eine „Stapelliste“ aller möglichen Rekombinationen von V-Familie – J-Familie (für *IGH*/*IGK* und *TRB*) oder V-Gen – J-Gen (für *TRG*), von denen jede über eine sortierte Liste der 200 häufigsten Lesevorgänge (höchster bis geringster prozentualer Anteil) verfügt.
VJ Usage *(V-J-Nutzung)*	Rohzählungen und Häufigkeiten der 200 häufigsten Rekombinationen von V-Familie – J-Familie (für *IGH*/*IGK* und *TRB*) oder V-Gen – J-Gen (für *TRG*).
VJ Usage Percent Graph *(Grafische Darstellung VJ-Nutzung in Prozent)*	Eine 3D-Darstellung der 200 häufigsten Sequenzhäufigkeiten jeder Rekombination von V-Familie – J-Familie (für *IGH/IGK* und *TRB*) oder V-Gen – J-Gen (für *TRG*).
VJ Usage Raw Graph *(Grafische Darstellung VJ-Rohnutzung)*	Eine 3D-Darstellung der 200 häufigsten Rohzählungen jeder Rekombination von V-Familie – J-Familie (für *IGH/IGK* und *TRB*) oder V-Ge – J-Gen (für *TRG*).
VJ Sequence Frequency *(VJ-Sequenzhäufigkeit)*	Eine „Stapelliste“ aller möglichen Rekombinationen von V-Familie – J-Familie (für *IGH*/*IGK* und *TRB*) oder V-Gen – J-Gen (für *TRG*), von denen jede über eine sortierte Liste der 200 häufigsten Lesevorgänge (höchster bis geringster prozentualer Anteil) verfügt.
Unique Reads *(Einzigartige Lesevorgänge)*	Eine FASTA-Datei einmaliger Sequenzen, sortiert nach deren Anzahl.

Hinweis: Das in der Tabelle oben angeführte *IGH* bezieht sich auf Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2 und *IGH* FR3-Analyse. Die grafischen Darstellungen der Häufigkeit für diese Genziele geben nur *IGH* im Titel an. Der Datenausgabeordner gibt an, welche der Framework-Regionen (FR) von der Software analysiert wurde. Diese Daten werden im Feld für den Datenspeicherort oben in der Tabelle der Lesevorgangszusammenfassung angezeigt.

Hinweis: Die *IGK*-Analyse umfasst zusätzliche Informationen zu weiteren Elementen im *IGK*-Locus, die an Rekombinationen beteiligt sind (IGKINTR und IGKDEL).

Hinweis: Die *TRB*-Analyse umfasst zusätzliche Informationen zu weiteren Elementen im *TRB*-Locus, die an Rekombinationen der D – J-Region beteiligt sind.

Hinweis: Häufigste 200: Ist diese Option ausgewählt, werden in den Tabellen die häufigsten Sequenzen (bis zu 200) für Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *TRB* und *IGK* angezeigt. In der Lesevorgangszusammenfassung werden für *TRG* alle Sequenzen angezeigt.

Hinweis: Die *Putative CDR3-Sequence (Putative CDR3-Sequenz)* wird bestimmt, indem ein Abgleich mit der genauen Definition einer CDR3-Sequenz stattfindet. Eine Mutation von Ankerpunkten oder eine Unterbrechung des Leserasters führt zur Ausgabe des Ergebnisses *not found (nicht gefunden)*.

ACHTUNG! V-/J-Genzuweisungen, die in der *Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)* aufgeführt werden, weisen manchmal den Wert *none (keine)* auf. Diese Zuweisungen basieren auf der Qualität des besten Alignments zwischen dem Lesevorgang und den Referenzgenen. Sollte das beste Alignment eine qualitative Schwelle nicht erreichen, kann keine zuverlässige Genzuweisung vorgenommen werden. Somit erhält die Zuweisung den Wert *none (keine)*.

ACHTUNG! Die Mutationsrate des partiellen V-Gens (%) zeigt *n/a (keine Angabe)* für *IGH* FR2 und FR3 an. Aufgrund der kürzeren Amplikongrößen dieser Ziele fällt die V-Gen-Abdeckung geringer aus, was zu ungenauen Berechnungen der Mutationsrate führt.

- ☐ Bei der Analyse des somatischen Hypermutationsstatus der Proben müssen die 4 häufigsten Lesevorgänge im Mittelpunkt der Analyse stehen (monoklonale oder biklonale Proben müssen auf die häufigsten 2 bzw. 4 Lesevorgänge beschränkt werden), da die somatische Hypermutationsrate (SHM) und die Leseraster-/Stoppcodon-Analysen bei diesen Lesevorgängen am informativsten sind. Da NGS-Plattformen nicht über eine Gewichtung verfügen, werden sehr viel mehr als nur die häufigsten 4 Reads sequenziert und analysiert, von denen die meisten seltene Umlagerungsereignisse sind oder Artefakten bei Amplifikation oder Sequenzierung zugeordnet werden können. SHM- und Leseraster-/Stoppcodon-Analysen sind in diesem Fall bei nicht-klonalen Lesevorgängen nicht hilfreich. Beachten Sie, dass Invivoscribe GRCh37 als Referenzsequenzen verwendet, und die Ergebnisse können leicht von der IMGT-Datenbank abweichen. Zudem werden zahlreiche Pseudogene und nicht funktionsfähige Gene aus der Analyse ausgeschlossen. Umlagerungen mit somatischem Hypermutationsstatus, der am oder nahe dem Grenzwert von 2,0 % liegt, müssen vorsichtig interpretiert werden, insbesondere bei Durchführung eines *IGH*-FR1-Assays, bei dem nur ein Teil der IGHV-Region analysiert wird, da die Sequenz vor der Bindungsstelle des Primers nicht berücksichtigt wird.

9. Technischer Support und Kundendienst

Wir schätzen Ihre Treue. Wir helfen Ihnen gerne, diese Software zu verstehen, und bieten Ihnen durchgehend von montags bis freitags technischen Support an, damit Sie die Tests effizient in Ihrem Labor durchführen können.

Kontaktdaten

Invivoscribe, Inc
10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | USA
Telefon: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Geschäftszeiten: 7:00 Uhr bis 17:00 Uhr PST/PDT
Technischer Kundendienst: support@invivoscribe.com | Kundenbetreuung: sales@invivoscribe.com | Webseite: www.invivoscribe.com

10. Symbole

Auf den Etiketten der Invivoscribe-NGS-Produkte befinden sich die folgenden Symbole.

REF	Katalognummer		Verfallsdatum
VOL	Reagenzvolumen	EC REP	Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
LOT	Chargennummer		Gebrauchsanweisung Beachten
	Lagerbedingungen	IVD	*In-vitro*-Diagnostikum
UDI	Eindeutige Gerätekennung		Hersteller
UK CA	UK-Konformität Geprüft	UKRP	Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
CH REP	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter	CE	Europäische Konformität
	Computerprogramm		

11. Haftungshinweis

Für rechtliche Hinweise im Zusammenhang mit diesem Produkt besuchen Sie bitte folgende Website:
https://invivoscribe.com/legal-notices/

12. Software – Häufig gestellte Fragen

F1: **Warum enthält meine ‚*Read Summary*' (Lesevorgangszusammenfassung) der Analyse von *IGH*, *IGK* oder *TRB* weniger als 200 Lesevorgänge?**

A1: Die LymphoTrack Dx Software – MiSeq führt während der Analyse ein Alignment der 200 häufigsten Lesevorgänge durch, die *Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung)* enthält jedoch nur Lesevorgänge mit einem Alignment für ein in der Referenz gefundenes V- oder J-Gen. Kann kein Alignment des Lesevorgangs mit der Referenz durchgeführt werden kann, wird er von der Lesevorgangszusammenfassung ausgeschlossen.

Es gibt zahlreiche Gründe dafür, warum das Alignment eines Lesevorgangs mit einer Referenz fehlschlägt. Meist liegt dies jedoch an Problemen mit der Probe, die zu einer umfangreichen, nicht-spezifischen Amplifikation führen. Entstehen kann ein solches Ereignis durch eine geringe Anzahl anvisierter Zellen in der Probe, schlechte PCR-Bedingungen oder Proben geringer Qualität (beispielsweise fragmentierte FFPE-Proben). Folgen Sie der Gebrauchsanweisung genau, um die Wahrscheinlichkeit solcher Ereignisse so weit wie möglich zu reduzieren.

F2: **Warum lautet die V-Zuweisung oder J-Zuweisung in der Tabelle *Read Summary* (*Lesevorgangszusammenfassung*) *none (keine)*?**

A2: Damit ein Lesevorgang einem bestimmten V- und/oder J-Gen zugewiesen werden kann, muss beim Alignment eine bestimmte qualitative Schwelle erfüllt werden. Ist das Alignment schlecht, kann keine sichere Zuweisung stattfinden. Stattdessen lautet der Wert *none (keine)*. Beachten Sie, dass einem Lesevorgang nicht sowohl für J- als auch für V-Gene der Wert ‚none' (keine) zugewiesen werden kann, da die Lesevorgänge sonst ausgeschlossen würden (siehe Frage 2).

F3: **Die *V–J Sequence Frequency Graph (Grafische Darstellung der V–J-Sequenzhäufigkeit)* weist in der Y-Achse seltsame Werte auf. Der *% total reads (prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lesevorgänge)* liegt in Millionenhöhe; wie ist das möglich?**

A3: Wahrscheinlich liegt es daran, dass das LymphoTrack Dx-Programm die falsche Dezimalformatierung für Ihre Region verwendet. Siehe Abschnitt 2 *Ausführen der Datenanalysesoftware*, insbesondere die Informationen zum Auswählen des Dezimaltrennzeichens.

F4: **Alle Grafikarbeitsblätter sind leer, die Arbeitsblätter ohne Grafiken enthalten aber Daten. Was ist mit den Grafiken passiert?**

A4: Möglicherweise ist die Standard-Leserichtung des Excel-Programms auf *Right-to-left (Rechts-nach-links)* anstatt *Left-to-right (Links-nach-rechts)* eingestellt. Wenn die Spalten einer leeren Tabelle rechts mit Spalte **A** beginnen, ändern Sie vor Verwendung des Makros für die Datenvisualisierung die Anzeigerichtung in *Left-to-right (Links-nach-rechts)*. Zum Ändern dieser Einstellung gehen Sie zu *Excel options (Excel-Optionen)*, und zwar von der Schaltfläche **Office** links oben, und klicken auf **Advanced (Erweitert)**, dann scrollen Sie zum Abschnitt *Display (Anzeige)*. Die Option *Default direction (Standardrichtung)* ist hier aufgeführt. Wenn Sie **Left-to-right (Links-nach-rechts)** wählen, können die Daten bei anschließenden Datenvisualisierungsläufe richtig dargestellt werden. Hinweis: Hierdurch wird die Anzeigerichtung geändert, bis die Einstellung rückgängig gemacht wird. Beim Schließen von Excel wird die Änderung nicht rückgängig gemacht.

F5: **Das Programm hat gestoppt, nachdem auf *‚Launch Program' (Programm starten)* geklickt wurde, und folgender Fehler wurde ausgegeben:**

Application terminated with error: Filename not compatible. Please use only MiSeq MSR software generated FASTQ files. (Anwendung mit Fehler beendet: Dateiname nicht kompatibel. Bitte ausschließlich mit MSR-Software generierte FASTQ-Dateien verwenden.)

For help with this error, please contact Invivoscribe Technical Support. (Wenden Sie sich für Hilfe bei diesem Fehler an den Technischen Support von Invivoscribe.)

A5: Die LymphoTrack Dx Software – MiSeq erwartet **.fastq* Dateien mit gepaartem Ende, die von der in der MiSeq-Maschine enthaltenen MiSeq Reporter (MSR) Software generiert wurden. Wenn die MSR-Software nicht zur Generierung von Sequenzdateien verwendet wurde, muss der Basen-Aufruf mit der MSR-Software ausgeführt werden. Weitere Informationen sind dem MiSeq-Benutzerhandbuch zu entnehmen.

Die Ausführung des Basen-Aufrufs mit der MSR-Software ist wichtig, da – obwohl andere Programme sehr vergleichbare Ergebnisse wie die MSR-Software (zum Beispiel Bcl2fastq) generieren können – diese Programme auch sehr unterschiedliche Ergebnisse generieren können, je nach den spezifischen Parametern. Der LymphoTrack Dx Assay ist nur gültig, wenn von der MSR-Software generierte FASTQ -Dateien analysiert werden.

F6: **Warum enthalten die Analysen offenbar weniger Lesevorgänge als erwartet?**

A6: Wenn laut Read Summary (Lesevorgangszusammenfassung) insgesamt null oder nur wenige Lesevorgänge analysiert wurden, prüfen Sie, ob beim Ausführen der LymphoTrack Dx Software – MiSeq der richtige Analysemodus (Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK, TRB* oder *TRG*) gewählt wurde. Sollte die Gesamtzahl der Lesevorgänge sehr niedrig ausfallen, vergleichen Sie die Größe der analysierten FASTQ -Dateien mit der Größe der FASTQ -Dateien auf dem MiSeq-Gerät. Sind die Dateien auf dem MiSeq-Gerät größer, müssen die Sequenzierungsdaten erneut übertragen werden, um sicherzustellen, dass der gesamte Datensatz analysiert wird.

Der MiSeq-Sequenzer zeigt beim Verarbeiten der Sequenzierungsdaten unterschiedliche Meldungen an. Möglicherweise lautet eine Meldung *Sequencing Complete (Sequenzierung abgeschlossen)* und eine andere *Analysis Complete (Analyse abgeschlossen)*. Werden die FASTQ -Daten zwischen Ausgabe dieser beiden Meldungen übertragen, kann es zu einer unvollständigen LymphoTrack Dx Analyse kommen.

F7: **Warum enthält . „Read Summary" (Lesevorgangszusammenfassung) einen Lesevorgang aus den zehn häufigsten Lesevorgängen, der nicht in der „Merged Read Summary" (zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung) zu finden ist?**

A7: Der „verschwundene" Lesevorgang wurde möglicherweise mit einem Lesevorgang zusammengelegt, der höher platziert war, oder das Alignment dieses Lesevorgangs war ungewöhnlich schlecht. Während der Zusammenlegung findet ein Alignment der Lesevorgänge der Lesevorgangszusammenfassung mit denen der einzigartigen Lesevorgänge statt. Lesevorgänge in der Lesevorgangszusammenfassung wurden jedoch so ausgerichtet, dass sie dem Alignment zur Referenz entsprechen, und sind möglicherweise Antisense-Versionen des Referenzgens. Dies geschieht nur, wenn das Alignment schlecht ist und wenn ein Sense- oder Antisense-Alignment fast gleichwertig ist und das Antisense-Alignment etwas besser war. In einem solchen Fall sollte der Lesevorgang am besten vollständig ignoriert werden.

ACHTUNG: **Verwenden Sie zur Bestimmung der Klonalität nur Lesevorgänge aus der *Merged Read Summary (zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung)*.**

F8: **Warum dauert die Analyse extrem lange (mehr als eine Stunde pro Probe)?**

A8: In der Protokolldatei ist aufgeschlüsselt, wie lange jeder Schritt dauert. Der Zeile *‚INFO: Decompressing files' (INFO: Dateien werden dekomprimiert)* folgt eine zweite Zeile, die die Anzahl der Dateien und die Dauer des Entpackens angibt. Diese Angabe ist in Millisekunden. Sollte das Entpacken mehrere Stunden dauern, prüfen Sie, ob sich die Zieldateien auf einem Server befinden. Normalerweise dauert das Ausführen eines I/O-intensiven Prozesses wie die Dekomprimierung über ein Netzwerk wesentlich länger. Kopieren Sie die Dateien nach Möglichkeit auf einen lokalen Computer, oder dekomprimieren Sie die Dateien direkt vor dem Ausführen dieser Software. Stellen Sie sicher, dass die komprimierten und dekomprimierten Dateien nicht im gleichen Ordner gespeichert sind. Die Software fährt nicht fort, wenn der Zielordner sowohl FASTQ - als auch FASTQ.GZ -Dateien enthält.

Sollten die nachfolgenden Parsing- und Analyseschritte viel Zeit in Anspruch nehmen, sind die FASTQ -Dateien möglicherweise sehr groß. Die FASTQ -Dateien sind beispielsweise dann sehr groß, wenn ein MiSeq-Lauf weniger als 24 Indizes aufweist und die sequenzierten Proben eine größere Lesetiefe aufweisen. Auch wäre es möglich, dass die Bibliothek unausgeglichen ist und einen höheren Anteil einer Probe mit einem bestimmten Index im Vergleich zum Anteil der Proben mit anderen Indizes umfasst. Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebene Analysedauer basiert auf der Annahme, dass ein 24-Index-Lauf mit ausgeglichenen Bibliotheken stattfindet.

F9: **Der vom MiSeq-Gerät berichtete Lauf Q30 erfüllt die Illumina-Spezifikation nicht. Wenn die LymphoTrack Analyse ausgeführt wurde und die Kontrollen dem Anschein nach erwartungsgemäß funktioniert haben, ist der Lauf dann wirklich fehlgeschlagen?**

A9: Der Lauf Q30 wird beim Basis-Aufruf-Prozess in Echtzeit berechnet. Zu diesem Zeitpunkt wurde keine sonstige Datenverarbeitung durchgeführt wie beispielsweise De-Multiplexing und Adapter-Trimming. Dies bedeutet, dass jede Sequenz, die von einem geringwertigen Index stammt oder außerhalb der Adaptersequenz auftritt, zum Q30-Wert beiträgt. Eine Sequenz außerhalb der Adaptersequenz ist normalerweise geringwertig, und dieses Szenario tritt häufig bei Primer-Dimern ein. Wenn eine Bibliothek eine ausreichende Stufe an Primer-Dimern aufweist, kann dies die Qualität von Lauf Q30 herabsetzen. Als zweite Überprüfung zeigt die Ausgabe des LymphoTrack Reporter den Index Q30-Wert an, der anhand aller getrimmten Lesevorgänge in diesem Index berechnet wurde. Wenn ein Index-Q30-Wert die Illumina-Spezifikation auch nicht erfüllt, muss der Index als fehlgeschlagen angesehen werden.

Q10: **Warum unterscheiden sich die Top 10 merged reads bei einer Wiederholung der Analyse?**

A10: Aufgrund der Sortierung von Sequenzen, von denen mehrere die exakt gleiche Anzahl an Reads aufweisen können sich die Top 10 merged read counts bei wiederholter Analyse geringfügig unterscheiden. Wenn mehrere Sequenzen identische Read Counts aufweisen kann die Software diese untereinander zufällig sortieren. Die hierdurch auiftretenden Unterschiede sind minimal und beeinflussen die Interpretation der Resultate nicht.