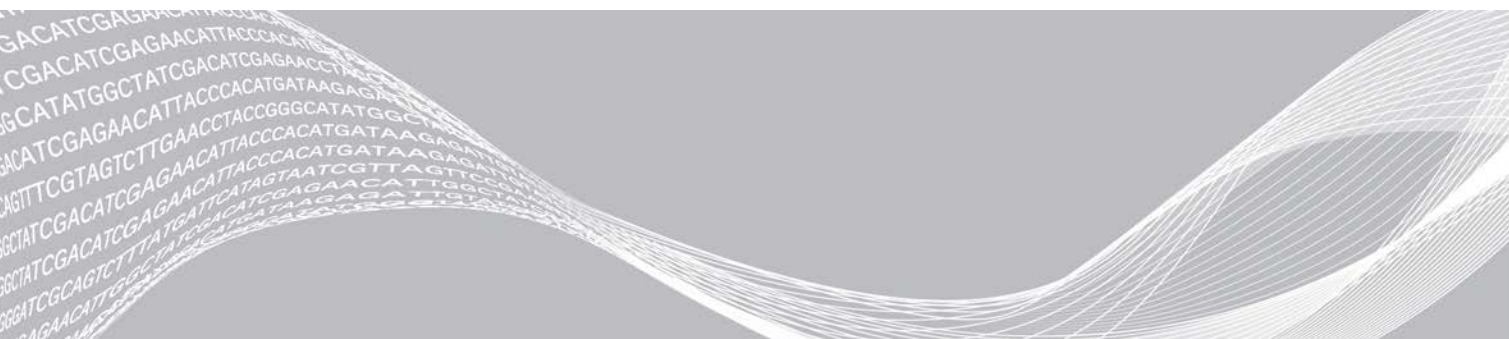


# Analytický modul Somatic Variant softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov)

Príručka pracovných postupov prístroja NextSeq 550Dx

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

Základné informácie	3
Zadávanie informácií o chode	4
Metódy analýzy	6
Zobrazenie údajov o chode a vzorke	7
Správa o analýze	8
Súbory s výstupmi analýzy	9
Stanovenie báz a diverzita indexov	15
História revízií	17
Technická pomoc	18



Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním produktu (produktov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovať akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu opísaného produktu (produktov). Pred použitím takéhoto produktu (produktov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

**NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE PRODUKTU (PRODUKTOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA PRODUKT (PRODUKTY).**

**SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU OPÍSANÉHO PRODUKTU (PRODUKTOV) (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).**

© 2021 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Základné informácie

Modul Somatic Variant softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) sa má používať s testom Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a prístrojom NextSeq 550Dx. Keď sa test používa s modulom Somatic Variant, test je určený na prípravu knižnic používaných na sekvenovanie DNA zo vzoriek tkaniva fixovaných formalínom a zaliatych do parafínu (FFPE). Test deteguje somatické mutácie pri nízkej frekvencii variantov.

Analytický modul vyhodnocuje krátke oblasti amplifikovanej DNA, resp. amplikóny, z hľadiska variantov. Cieľené sekvenovanie amplikónov umožňuje vysoké pokrytie konkrétnych oblastí vo veľkom množstve vzoriek. Analytický modul vykonáva sekundárnu analýzu a vytvára správy zo sekvenovacích chodov za použitia dvojvláknového prístupu, ktorý zahŕňa priame aj reverzné oligo pooly. Pozrite si príbalový leták k súprave *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* (dokument č. 1000000029772).

Analytický modul Somatic Variant vyžaduje sekvenovací materiál na 300 cyklov. Viac informácií nájdete v príbalovom letáku k súprave reagentov *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2* alebo *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5*.

## Informácie o tejto príručke

V tejto príručke sú uvedené pokyny na nastavenie parametrov chodu na sekvenovanie a analýzu pre analytický modul Somatic Variant. Informácie o ovládacom paneli softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) a nastaveniach systému nájdete v referenčnej príručke prístroja *NextSeq 550Dx* (dokument č. 100000009513).

## Zobrazenie softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov)

Rozhranie softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) sa zobrazuje v rámci operačného softvéru NextSeq 550Dx (NOS) alebo prostredníctvom webového prehliadača. Podporovaným webovým prehliadačom je Chromium.



### POZNÁMKA

Ak používate nepodporovaný webový prehliadač, po zobrazení hlásenia „Confirm Unsupported Browser“ (Potvrdiť nepodporovaný prehliadač) si stiahnite podporovaný prehliadač. Podporovanú verziu prehliadača Chromium si stiahnete kliknutím na „[here](#)“ (tu).

## Zobrazenie na monitore prístroja

- 1 Ak chcete zobraziť rozhranie softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) na monitore prístroja, vyberte jednu z nasledujúcich možností:
  - ▶ Na domovskej obrazovke NOS vyberte možnosť **Local Run Manager** (Správca lokálnych chodov). Po dokončení sa do NOS vrátite kliknutím na X v pravom hornom rohu.
  - ▶ Vyberte ikonu Minimize NOS (Minimalizovať NOS), otvorte webový prehliadač Chromium, ktorý je nainštalovaný v prístroji, a do riadka na adresu zadajte **http://localhost**. Len používateľia s oprávneniami správcu môžu minimalizovať NOS.

## Zobrazenie z počítača pripojeného k sieti

- 1 Otvorte v počítači s prístupom k tej istej sieti, ku ktorej je pripojený prístroj, webový prehliadač Chromium a pripojte sa pomocou IP adresy prístroja alebo názvu prístroja. Napríklad **http://myinstrument**.

## Zadávanie informácií o chode

### Nastavenie parametrov

- 1 Prihláste sa do softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov).
- 2 Vyberte možnosť **Create Run** (Vytvoriť chod) a potom **Somatic Variant** (Somatický variant).
- 3 Zadajte názov chodu, ktorým sa identifikuje chod od sekvenovania cez analýzu. Použite alfanumerické znaky, medzery, znaky podčiarknutia alebo pomlčky.
- 4 **[Voliteľné]** Zadajte opis chodu, čo pomôže pri identifikácii chodu. Použite alfanumerické znaky, medzery, znaky podčiarknutia alebo pomlčky.
- 5 Z rozbaľovacieho zoznamu vyberte počet vzoriek a súbor indexov. Pri výbere zväzšte nasledujúce informácie.
  - ▶ V rozbaľovacom zozname sa nachádzajú počty vzoriek so súborom indexov. Napríklad 24-Set 1 znamená, že sa má otestovať 24 vzoriek s indexmi zo súborov indexov 1.
  - ▶ Čísla súboru indexov označujú rôzne súbory indexov i5. Súbor 1 aj súbor 2 predstavujú index diverzity. Dva súbory indexov sa ponúkajú preto, aby sa zabránilo vyčerpaniu jedného súboru.
  - ▶ Vyberte taký počet vzoriek, ktorý sa nachádza najbližšie k počtu vzoriek, ktoré chcete testovať. Ak sa v zozname nenachádza presný počet vzoriek, vyberte ten najbližší, no musí byť nižší ako počet vzoriek, ktoré chcete testovať. Napríklad ak chcete otestovať 18 vzoriek, vyberte 16 vzoriek.
  - ▶ Kombinácie jamiek na vzorky a indexov, ktoré spĺňajú požiadavky diverzity, sú zvýraznené nazeleno. Ak vyberiete iné kombinácie jamiek a indexov a požiadavky diverzity nie sú splnené, budete o tom informovaní pri ukladaní chodu.

### Importovanie súborov manifestu pre chod

- 1 Uistite sa, že manifesty, ktoré chcete importovať, sú dostupné v sieťovom umiestnení alebo na jednotke USB.
- 2 Vyberte možnosť **Import Manifests** (Importovať manifesty).
- 3 Prejdite do súboru manifestov a vyberte manifesty, ktoré chcete pridať.



#### POZNÁMKA

Ak chcete sprístupniť súbory manifestov pre všetky chody využívajúce analytický modul Somatic Variant, manifesty pridajte pomocou funkcie Module Settings (Nastavenia modulu). Táto funkcia vyžaduje povolenia používateľa na úrovni správcu. Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke prístroja NextSeq 550Dx* (dokument č. 100000009513).


### Špecifikovanie vzoriek pre chod

Špecifikujte vzorky pre chod pomocou jednej z možností a pokynov, ktoré nasledujú.


- ▶ **Manuálne zadanie vzoriek** – použite prázdnu tabuľku na obrazovke Create Run (Vytvoriť chod).
- ▶ **Importovanie vzoriek** – prejdite do externého súboru vo formáte s hodnotami oddelenými čiarkami (\*.csv). Vzor si môžete stiahnuť na obrazovke Create Run (Vytvoriť chod).

Po vyplnení tabuľky na vzorky si môžete informácie o vzorkách exportovať do externého súboru. Súbor používajte ako referenciu pri príprave knižníc alebo ho importujte pre ďalší chod.

## Manuálne zadávanie vzoriek

- 1 Do poľa Sample Name (Názov vzorky) zadajte jedinečný názov vzorky. Použite alfanumerické znaky, pomlčky alebo znaky podčiarknutia. Názov vzorky sa automaticky doplní do príslušnej jamky v ďalšom poole.
- 2 **[Voliteľné]** Pri pozitívnych alebo negatívnych kontrolných vzorkách kliknite pravým tlačidlom a vyberte typ kontrolnej vzorky. Typ kontrolnej vzorky v jednej jamke na vzorky sa automaticky doplní v príslušnej jamke v inom poole s tou istou kontrolnou vzorkou.
- 3 **[Voliteľné]** Do poľa Sample Description (Popis vzorky) zadajte popis vzorky. Použite alfanumerické znaky, pomlčky alebo znaky podčiarknutia. Popis vzorky sa automaticky doplní do príslušnej jamky v ďalšom poole. Popisy vzoriek sú pridružené k ID vzorky. Ak sa to isté ID vzorky použije v neskoršom chode, popisy vzorky sa prepíšu.
- 4 Z rozbaľovacieho zoznamu Index 1 (i7) vyberte Index 1. Ak použijete navrhované jamky na vzorky, softvér automaticky vyplní adaptéry indexov i7 a i5, ktoré spĺňajú požiadavky na diverzitu indexov. Ak nie je v zozname uvedený presný počet vzoriek, ktoré chcete otestovať, nezabudnite vybrať adaptéry indexov pre dodatočné jamky. Ak potrebujete vybrať indexy pre dodatočné jamky alebo nepoužijete odporúčané kombinácie adaptérov indexov, pred výberom indexov si prečítajte časť *Stanovenie báz a diverzita indexov na strane 15*.
- 5 Z rozbaľovacieho zoznamu Index 2 (i5) vyberte Index 2.
- 6 Z rozbaľovacieho zoznamu Manifest vyberte súbor manifestu. Vzorky v poole A vyžadujú iný manifest ako vzorky v poole B.
- 7 Zvoľte možnosť zobrazenia, tlačte alebo uloženia rozloženia platničky ako referencie pri príprave knižníc:
  - ▶ Rozloženie platničky zobrazíte výberom ikony  **tlačte**. Ak chcete vytlačiť rozloženie platničky, vyberte možnosť **Print** (Tlačiť).
  - ▶ Ak chcete exportovať informácie o vzorke do externého súboru, vyberte možnosť **Export** (Exportovať).Uistite sa, že manifest a informácie o vzorke sú správne. Nesprávne informácie môžu ovplyvniť výsledky.
- 8 Vyberte možnosť **Save Run** (Uložiť chod).

## Importovanie vzoriek

- 1 Vyberte možnosť **Import Samples** (Importovať vzorky) a vyhľadajte umiestnenie súboru s informáciami o vzorke. Importovať môžete dva typy súborov.
  - ▶ Ak chcete vytvoriť nové rozloženie platničky, na obrazovke Create Run (Vytvoriť chod) vyberte možnosť **Template** (Vzor). Vzorový súbor obsahuje správne nadpisy stĺpcov na importovanie. Do každého stĺpca zadajte informácie pre vzorky v chode. Vymažte ukázkové informácie v políčkach, ktoré nepoužijete, a potom súbor uložte.
  - ▶ Použite súbor s informáciami o vzorke, ktorý sa exportoval z modulu Somatic Variant pomocou funkcie Export (Exportovať).
- 2 Rozloženie platničky zobrazíte výberom ikony  **tlačte**.
- 3 Ak chcete rozloženie platničky vytlačiť ako referenciu pri príprave knižníc, vyberte možnosť **Print** (Tlačiť).

- 4 **[Voliteľné]** Ak chcete exportovať informácie o vzorke do externého súboru, vyberte možnosť **Export** (Exportovať).  
Uistite sa, že manifest a informácie o vzorke sú správne. Nesprávne informácie môžu ovplyvniť výsledky.
- 5 Vyberte možnosť **Save Run** (Uložiť chod).

## Úprava chodu

Pokyny na úpravu informácií vo vašom chode pred sekvenovaním nájdete v *referenčnej príručke prístroja NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

## Metódy analýzy

Analytický modul Somatic Variant vykonáva nasledujúce kroky analýzy a potom zapisuje súbory s výstupmi analýzy do priečinka Alignment (Zarovnanie).

- ▶ Demultiplexuje čítania indexov.
- ▶ Generuje súbory FASTQ.
- ▶ Zarovnáva s referenciou.
- ▶ Identifikuje varianty.

## Demultiplexovanie

Demultiplexovanie porovnáva každú sekvenciu čítania indexu so sekvenciami indexov špecifikovaných pre chod. V tomto kroku sa neberú do úvahy žiadne kvalitatívne hodnoty.

Čítania indexov sa identifikujú týmito krokmi:

- ▶ Vzorky sa očísľujú od 1 podľa poradia, v akom sú uvedené pre chod.
- ▶ Číslo vzorky 0 je vyhradené pre klastre, ktoré neboli priradené ku vzorke.
- ▶ Klastre sa ku vzorke priradujú vtedy, keď sa sekvencia indexov presne zhoduje alebo keď existuje maximálne jedna nezhoda na čítanie indexu.

## Generovanie súborov FASTQ

Po demultiplexovaní softvér vygeneruje súbory predbežnej analýzy vo formáte FASTQ, čo je textový formát používaný na znázornenie sekvencií. Súbory FASTQ obsahujú čítania každej vzorky a súvisiace kvalitatívne skóre. Klastre, ktoré nespĺňajú požiadavky filtra, sú vylúčené.

Každý súbor FASTQ obsahuje čítania len jednej vzorky, pričom názov tejto vzorky je uvedený v názve súboru FASTQ. Súbory FASTQ predstavujú primárny výstup na zosúladenie. Na vzorku na oligo pool sa vygeneruje osem súborov FASTQ (štyri z čítania 1 a štyri z čítania 2), výsledkom čoho je celkovo 16 súborov FASTQ na vzorku.

## Zarovnanie

Počas kroku zarovnania pásmový Smithov-Watermanov algoritmus zarovnáva klastre z každej vzorky oproti sekvenciám amplicónov špecifikovaných v súbore manifestu.

Pásmový Smithov-Watermanov algoritmus vykonáva semiglobálne zarovnania sekvencií s cieľom určiť podobné oblasti medzi dvoma sekvenciami. Namiesto porovnania celej sekvencie Smithov-Watermanov algoritmus porovnáva segmenty všetkých možných dĺžok.

Čítanie oboch koncov (tzv. paired-end) sa vyhodnocuje v súvislosti s jeho zarovnaním voči relevantným sekvenciám prób pre dané čítanie.

- ▶ Čítanie 1 sa vyhodnocuje oproti reverznému komplementu nižšie položených oligonukleotidov, ktoré sú špecifické pre lokus (DLSO).
- ▶ Čítanie 2 sa vyhodnocuje oproti vyššie položeným oligonukleotidom, ktoré sú špecifické pre lokus (ULSO).
- ▶ Ak sa začiatok čítania zhoduje so sekvenciou próby a existujú maximálne tri rozdiely (nezhody alebo posuny kvôli hlavným indelom), celá dĺžka čítania sa zarovná s cieľovým amplikónom tejto sekvencie.
- ▶ Indely v rámci DLSO a ULSO neboli vzhľadom k chemickým vlastnostiam analýzy pozorované.

Na základe frekvencie nezhôd buď v oblasti záujmu, alebo celom amplikóne (v závislosti od dĺžky amplikónu) sa zarovnanie filtrujú z výsledkov zarovnaní. Vyfiltrované zarovnanie sa zapisujú do súborov zarovnaní a nepoužívajú sa pri stanovení variantov (tzv. calling).

## Stanovenie variantov



Program Pisces Variant Caller, ktorý vyvinula spoločnosť Illumina, identifikuje varianty s malým výskytom vo vzorke DNA.

Program Pisces Variant Caller identifikuje SNV, MNV a malé indely v troch krokoch:

- ▶ Samostatne zvažuje každú pozíciu v referenčnom genóme.
- ▶ Počíta bázy v danej pozícii pre zarovnané čítania, ktoré presahujú pozíciu.
- ▶ Vypočítava skóre variantu, ktoré meria kvalitu stanovenia pomocou Poissonovho modelu. Varianty s kvalitatívnym skóre nižším ako Q30 sa vylúčia.

Varianty sa najskôr stanovujú samostatne pre každý pool. Potom sa varianty z každého poolu porovnávajú a zlúčia do jedného výstupného súboru. Ak sa variant nachádza v oboch pooloch a všetky požiadavky filtrov uvedené v *Poznámky v súboroch VCF na strane 12* sú splnené, variant sa v súbore stanovenia variantov (VCF) označí ako PASS (Úspešný).

## Zobrazenie údajov o chode a vzorke

- 1 Na ovládacom paneli softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) kliknite na názov chodu.
- 2 Na karte Run Overview (Prehľad chodu) skontrolujte metriku sekvenovacieho chodu.
- 3 **[Voliteľné]** Ak chcete skopírovať dráhu priečinka s výstupom chodu, kliknite na ikonu **kopírovania do schránky** .
- 4 Kliknutím na kartu Sequencing Information (Informácie o sekvenovaní) skontrolujte parametre chodu a informácie o spotrebnom materiáli.
- 5 Ak chcete zobrazit' umiestnenie správy o analýze, kliknite na kartu Samples and Results (Vzorky a výsledky).
  - ▶ Ak sa analýza opakovala, otvorte rozbaľovací zoznam Select Analysis (Vybrať analýzu) a vyberte príslušnú analýzu.
- 6 Ak chcete skopírovať dráhu priečinka s analýzou, kliknite na **ikonu kopírovania do schránky** .

Viac informácií o kartách Run Overview (Prehľad chodu) a Sequencing Information (Informácie o sekvenovaní) a o tom, ako zmeniť poradie analýzy, nájdete v *referenčnej príručke prístroja NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

## Správa o analýze

Výsledky analýzy sú zhrnuté na karte Samples and Results (Vzorky a výsledky) a ako súhrnná správa v priečinku Alignment (Zarovnanie). Pre každú vzorku je taktiež k dispozícii správa vo formáte súboru PDF.

### Informácie o karte Samples and Results (Vzorky a výsledky)

1 Kliknutím na vzorku v zozname zobrazíte správu o vzorke.

Tabuľka 1 Informácie o chode a vzorke

Hlavička stĺpca	Popis
Run Status (Stav chodu)	Uvádza, či bol sekvenovací chod úspešný alebo neúspešný.
Total Yield (GB) (Celková výťažnosť (GB))	Počet báz stanovených v sekvenovacom chode. Zobrazuje prahovú hodnotu úspešnosti a úspešný alebo neúspešný stav.
% ≥ Q30	Percento čítaní v sekvenovacom chode so skóre kvality 30 (Q30) alebo vyšším. Zobrazuje prahovú hodnotu úspešnosti a úspešný alebo neúspešný stav.
Sample Name (Názov vzorky)	Názov vzorky poskytnutý pri vytváraní chodu.
Total PF Reads (Celkový počet čítaní PF)	Celkový počet čítaní, ktoré splnili požiadavky filtra.
Read 1% ≥ Q30 (Čítanie 1 % ≥ Q30)	Percento čítaní v čítaní 1 pre vzorku so skóre kvality 30 (Q30) alebo vyšším.
Read 2% ≥ Q30 (Čítanie 2 % ≥ Q30)	Percento čítaní v čítaní 2 pre vzorku so skóre kvality 30 (Q30) alebo vyšším.
Autosome Call Rate (Miera stanovenia autozómov)	Počet genómových pozícií medzi autozómami (chromozómy 1 až 22), ktoré spĺňajú vopred definovanú prahovú hodnotu spoľahlivosti, vydelený celkovým počtom vyšetrovaných autozomálnych genómových pozícií. Miera stanovenia sa opisuje po jednotlivých vzorkách a nahlasuje sa ako percento, ktoré sa vypočítava ako 1 mínus (počet autozomálnych pozícií s nekompletnými stanoveniami vydelený celkovým počtom sekvenovaných autozomálnych pozícií).

Tabuľka 2 Informácie o správe o vzorke

Hlavička stĺpca	Popis
Sample (Vzorka)	Názov vzorky poskytnutý pri vytváraní chodu.
Report Date (Dátum správy)	Dátum vytvorenia správy.
Sample Information (Informácie o vzorke)	ID vzorky poskytnuté pri vytváraní chodu, celkový počet čítaní vo vzorke, ktoré vyhoveli požiadavkám filtra, percento čítaní vzorky so skóre kvality 30 (Q30) alebo vyšším a miera autozomálnych stanovení.
Amplicon Summary (Zhrnutie amplikónov)	Celkový počet sekvenovaných oblastí amplikónov a celková dĺžka v básových pároch sekvenovaných amplikónov v cieľových oblastiach pre vzorku a súbor manifestov. Súbor manifestov určuje referenčný genóm a cieľové referenčné oblasti použité v kroku zarovnaní.
Read Level Statistics (Štatistika úrovne čítania)	Počet a percento čítaní vzorky, ktoré pokrývajú každú referenčnú pozíciu pre čítanie 1 a čítanie 2 v poole A a poole B.
Variants Summary (Súhrn variantov)	Počet SNV, inzercíí a delécií detegovaných pre vzorku, ktoré splnili navrhnuté hodnoty s cieľom určiť, či sa kvalitatívne výsledky nachádzajú v rámci prijateľného rozsahu.



Hlavička stĺpca	Popis
Coverage Summary (Súhrn pokrytia)	Celkový počet zarovnaných báz vydelený veľkosťou cieľovej oblasti a percento oblastí amplicónov s hodnotami pokrytia väčšími ako dolná prahová hodnota pokrytia ( $0,2 * \text{priemerné pokrytie amplicónu}$ ) pre vzorku v poolu A a poolu B.
Coverage Plots (Grafy pokrytia)	Graf pokrytia oblastí amplicónov znázorňuje pokrytie v rámci oblastí amplicónov vzorky. Oblasti s hodnotami pokrytia nižšími ako je prahová hodnota pokrytia sa zvýraznia načerveno. Priemer všetkých hodnôt označuje oranžová čiara. Poskytne sa graf pokrytia poolu A a poolu B.
Software Versions (Verzie softvéru)	Verzie softvéru pri sekvenovaní vzorky. Zahŕňa verziu operačného softvéru NextSeq 550Dx (NOS), softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov), softvéru RTA a modulu Somatic Variant.

## Súbory s výstupmi analýzy

Pre analytický modul Somatic Variant sa generujú nasledujúce súbory s výstupmi analýzy, ktoré poskytujú výsledky analýzy na zarovnanie a stanovenie variantov. Súbory s výstupmi analýzy sa nachádzajú v priečinku Alignment (Zarovnanie).

Názov súboru	Popis
Demultiplexovanie (*.txt)	Predbežné súbory obsahujúce súhrnné výsledky demultiplexovania.
FASTQ (*.fastq.gz)	Predbežné súbory obsahujúce stanovené bázy s kvalitatívnym skóre. Súbory FASTQ predstavujú primárny vstup na krok zarovnanie.
Súbory zarovnané vo formáte BAM (*.bam)	Obsahujú zarovnané čítania pre danú vzorku.
Súbory so stanovenými variantami na pool vo formáte VCF (*.vcf)	Obsahujú varianty stanovené v každej pozícii buď z priameho, alebo reverzného poolu.
Súbory so stanovenými variantmi v genóme vo formáte VCF (*.genome.vcf.gz)	Obsahujú genotyp pre každú pozíciu, či už stanovenú ako variant, alebo ako referencia.
Súbory so stanovenými konsenzuálnymi variantmi vo formáte VCF (*.vcf.gz)	Obsahujú varianty stanovené v každej pozícii pre oba pooly.
AmpliconCoverage_M1.tsv	Obsahuje informácie o pokrytí na amplicón pre každý poskytnutý manifest. MČ. predstavuje číslo manifestu.

## Formát súborov demultiplexovania

Pri procese demultiplexovania sa čítajú sekvencie indexov pripojené ku každému klastru s cieľom určiť, z ktorej vzorky klaster pochádza. Mapovanie medzi klastrami a číslom vzorky sa zapisuje do súboru demultiplexovania (\*.demux) pre každú dlaždicu prietokovej komôrky.

Formát pomenovania súboru demultiplexovania je `s_1_X.demux`, kde X je číslo dlaždice.

Súbory demultiplexovania sa začínajú nadpisom:

- ▶ verzia (4-bajtové celé číslo), aktuálne 1,
- ▶ počet klastrov (4-bajtové celé číslo).

Zvyšok súboru tvoria čísla vzoriek pre každý klaster z dlaždice.

Po dokončení kroku demultiplexovania softvér vygeneruje súbor demultiplexovania s názvom `DemultiplexSummaryF1L1.txt`.

- ▶ F1 v názve súboru predstavuje číslo prietokovej komôrky.

- ▶ L1 v názve súboru predstavuje číslo pruhu.
- ▶ Výsledky demultiplexovania v tabuľke s 1 riadkom na dlaždicu a 1 stĺpcom na vzorku vrátane vzorky 0.
- ▶ Najčastejšie sa vyskytujúce sekvencie v čítaniach indexov.

## Formát súborov FASTQ

FASTQ je textový formát súborov, ktorý obsahuje stanovené bázy a kvalitatívne hodnoty na čítanie. Každý záznam obsahuje 4 riadky:

- ▶ identifikátor,
- ▶ sekvencia,
- ▶ znamienko plus (+),
- ▶ Phredovo skóre kvality v ASCII + 33 kódovanom formáte.

Identifikátor je naformátovaný ako:

@Prístroj:ID chodu:ID prietokovej komôrky:Pruh:Dlaždica:X:Y Č. čítania:Príznak filtra:0:Číslo vzorky

Príklad:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAAA9#:<#<;<<<?????#
```

## Formát súborov BAM

Súbor BAM (\*.bam) je komprimovaná binárna verzia súboru SAM, ktorá sa používa na zobrazenie zarovnaných sekvencií do 128 Mb. Formáty SAM a BAM sú podrobne opísané na stránke [samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf](https://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf).

Súbory BAM využívajú formát pomenovania **NázovVzorky\_S#.bam**, kde # je číslo vzorky určené podľa poradia, v ktorom sú vzorky uvedené pre chod.

Súbory BAM obsahujú časť s hlavičkou a časť so zarovnaním:

- ▶ **Hlavička** – Obsahuje informácie o celom súbore (napr. názov vzorky, dĺžka vzorky a metóda zarovnaní). Zarovnaní v časti so zarovnaním sú spojené so špecifickými informáciami v časti s hlavičkou.
- ▶ **Zarovnaní** – Obsahuje názov čítania, sekvenciu čítania, informácie o zarovnaní a prispôbené príznaky. Názov čítania zahŕňa chromozóm, štartovacie súradnice, kvalitu zarovnaní a reťazec deskriptora zhody.

V časti so zarovnaním sú uvedené nasledujúce informácie pre každé čítanie alebo čítaný pár:

- ▶ **AS:** kvalita zarovnaní na oboch koncoch,
- ▶ **BC:** štítok (tzv. tag) čiarového kódu, ktorý indikuje ID demultiplexovanej vzorky súvisiacej s čítaním,
- ▶ **SM:** kvalita zarovnaní na jednom konci,
- ▶ **XC:** reťazec deskriptora zhody,
- ▶ **XN:** štítok (tzv. tag) názvu amplikónu, v ktorom je zaznamenané ID amplikónu súvisiaceho s čítaním.

Súbory indexov BAM (\*.bam.bai) poskytujú index zodpovedajúceho súboru BAM.

## Formát súborov VCF

Formát stanovenia variantov (VCF) je bežný formát súborov vyvinutých v genomickej odbornej komunite. Obsahuje informácie o variantoch zistených v špecifických pozíciách v referenčnom genóme. Súbor VCF majú príponu .vcf.

V hlavičke súborov VCF sa uvádza verzia formátu súboru VCF a verzia prekladača (tzv. caller) variantu a tiež poznámky použité vo zvyšku súboru. V hlavičke súboru VCF je tiež uvedený súbor referenčného genómu a súbor BAM. V poslednom riadku hlavičky sú uvedené nadpisy stĺpcov pre riadky s údajmi. V každom riadku s údajmi súborov VCF sú uvedené informácie o jednom variante.

## Hlavičky súborov VCF

Hlavička	Popis
CHROM	Chromozóm referenčného genómu. Chromozómy sa zobrazujú v rovnakom poradí ako v referenčnom súbore FASTQ.
POS	Jednobázová pozícia variantu v referenčnom chromozóme. Pre SNP je táto pozícia referenčná báza s variantom; pre indely a delécie je táto pozícia referenčná báza bezprostredne pred variantom.
ID	Číslo rs pre variant získaný z dbSNP.txt (ak je to uplatniteľné). Ak sa na tomto mieste nachádza viacero čísel rs, zoznam je oddelený bodkočiarkami. Ak pre túto pozíciu neexistuje žiadny dbSNP vstup, použije sa značka chýbajúcej hodnoty („“).
REF	Referenčný genotyp. Napríklad delécia jedného T je vyjadrená ako referenčný TT alebo alternatívny T. Variant s jedným nukleotidom z A na T je vyjadrený ako referenčný A a alternatívny T.
ALT	Alely, ktoré sa líšia od referenčného čítania. Napríklad inzercia jediného T je vyjadrená ako referenčný A a alternatívny AT. Variant s jedným nukleotidom z A na T je vyjadrený ako referenčný A a alternatívny T.
QUAL	Skóre kvality podľa Phredovej škály priradené k prekladaču (tzv. caller) variantu. Vyššie skóre označuje vyššiu istotu vo variante a nižšiu pravdepodobnosť chýb. Pre skóre kvality Q je odhadovaná pravdepodobnosť chyby $10^{-(Q/10)}$ . Napríklad súbor stanovení Q30 má mieru výskytu chyby 0,1 %. Mnoho prekladačov variantov prideľuje skóre kvality na základe svojich štatistických modelov, ktoré sú vysoké v porovnaní s pozorovanou mierou výskytu chýb.

## Poznámky v súboroch VCF

Hlavička	Popis
<b>FILTER</b>	<p>Ak je vyhovené všetkým filtrom, do stĺpca na filter sa zapíše <b>PASS</b> (Úspešné).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>LowDP</b> – platí pre miesta s hĺbkou pokrytia pod 450x v každom poolu. Pri pozíciách amplicónov pokrytých priamym aj reverzným čítaním ide o ekvivalent pokrytia jedného čítania 900x.</li> <li>• <b>LowGQ</b> – kvalita genotypizácie (GQ) je pod hraničnou hodnotou.</li> <li>• <b>q30</b> – skóre kvality &lt; 30.</li> <li>• <b>LowVariantFreq</b> – frekvencia variantov je pod danou prahovou hodnotou.</li> <li>• <b>PB</b> – odchýlka poolu prôb. Variant sa nenašiel alebo sa našiel v jednom alebo dvoch pooloch prôb pri nízkej frekvencii.</li> <li>• <b>R3x6</b> – počet susediacich opakovaní (dĺžky 1 až 3 bp) stanoveniam variantov <math>\geq 6</math>.</li> <li>• <b>SB</b> – odchýlka vlákna je väčšia ako daná prahová hodnota.</li> </ul>
<b>INFO (INFORMÁCIE)</b>	<p>V stĺpci INFO sú možné tieto záznamy:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>AC</b> – počet alel v genotypoch pre každú ALT alelu v tom istom poradí, ako sú uvedené.</li> <li>• <b>AF</b> – frekvencia alel pre každú ALT alelu v takom istom poradí, ako sú uvedené.</li> <li>• <b>AN</b> – celkový počet alel v stanovených genotypoch.</li> <li>• <b>CD</b> – príznak, ktorý označuje, že sa SNP vyskytuje v oblasti kódovania aspoň 1 záznamu referenčného génu (RefGene).</li> <li>• <b>DP</b> – hĺbka (počet stanovení báz zarovnaných k pozícii a použitých pri stanovení variantov).</li> <li>• <b>Exon</b> – čiarkami oddelený zoznam oblastí exónov prečítaných z referenčného génu.</li> <li>• <b>FC</b> – funkčný dôsledok.</li> <li>• <b>GI</b> – čiarkami oddelený zoznam ID génov prečítaných z referenčného génu.</li> <li>• <b>QD</b> – spoľahlivosť/kvalita variantov podľa hĺbky.</li> <li>• <b>TI</b> – čiarkami oddelený zoznam ID transkriptov prečítaných z referenčného génu.</li> </ul>
<b>FORMAT (FORMÁT)</b>	<p>V stĺpci formátu sú políčka oddelené dvojbodkami. Napríklad GT:GQ. Zoznam poskytnutých políčok závisí od použitého prekladača (tzv. caller) variantov. K dispozícii sú tieto políčka:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>AD</b> – záznam v tvare X, Y, kde X je počet referenčných stanovení a Y je počet alternatívnych stanovení.</li> <li>• <b>DP</b> – približná hĺbka čítania; čítanie s MQ = 255 alebo zlými väzbami sú odfiltrované.</li> <li>• <b>GQ</b> – kvalita genotypu.</li> <li>• <b>GQX</b> – kvalita genotypu. GQX je minimum hodnoty GQ a stĺpca QUAL. Vo všeobecnosti sú tieto hodnoty podobné; keďže GQX predstavuje minimum, je to konzervatívnejšie meradlo kvality genotypu.</li> <li>• <b>GT</b> – genotyp. 0 zodpovedá referenčnej báze, 1 zodpovedá prvému záznamu v stĺpci ALT atď. Lomka (/) znamená, že k dispozícii nie sú žiadne informácie o fázovaní.</li> <li>• <b>NL</b> – úroveň šumu; odhad šumu stanovenia báz v tejto pozícii.</li> <li>• <b>PB</b> – odchýlka poolu prôb. Hodnoty bližšie k 0 označujú väčšiu odchýlku smerom k jednému poolu prôb a nižšiu istotu pri stanovení variantu.</li> <li>• <b>SB</b> – odchýlka vlákna v tejto pozícii. Väčšie negatívne hodnoty označujú menšiu odchýlku; hodnoty blízko 0 označujú väčšiu odchýlku.</li> <li>• <b>VF</b> – frekvencia variantov; percento čítaní podporujúcich alternatívnu alelu.</li> </ul>
<b>SAMPLE (VZORKA)</b>	Stĺpec vzorky udáva hodnoty špecifikované v stĺpci FORMAT (FORMÁT).

## Súbory VCF genómu

Súbory VCF genómu (gVCF) sú súbory typu VCF v4.1, ktoré sa riadia súborom konvencií na vyjadrenie všetkých miest v rámci genómu v primerane kompaktnom formáte. Súbory gVCF (\*.genome.vcf.gz) obsahujú všetky miesta v oblasti záujmu v jedinom súbore pre každú vzorku.

Súbor gVCF zobrazuje absenciu stanovenia v pozíciách, ktoré nespĺnili všetky požiadavky filtrov. Štítok genotypu (GT) ./. označuje žiadne stanovenie.

Viac informácií nájdete na stránke [sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf](https://sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf).

## Súbory VCF Per-Pool a Consensus

Pracovný postup modulu Somatic Variant generuje 2 skupiny súborov stanovenia variantov.

- ▶ **Súbory VCF Per-pool** – obsahujú varianty stanovené buď v priamom, alebo reverznom poolu. Súbory Per-pool sa zapisujú do priečinka VariantCallingLogs.
- ▶ **Súbory VCF Consensus** – obsahujú varianty stanovené v oboch pooloch. Súbory Consensus sa zapisujú do priečinka Alignment (Zarovnanie).

Súbory VCF Per-pool a Consensus VCF zahŕňajú súbory VCF (\*.vcf) aj gVCF (\*.genome.vcf) a používajú nasledujúcu konvenciu pomenovania, kde S# predstavuje poradie, v akom je vzorka uvedená pre chod:

- ▶ **Správy pre všetky miesta** – SampleName\_S#.genome.vcf
- ▶ **Správy len pre varianty** – SampleName\_S#.vcf

Softvér porovnáva súbory VCF Per-pool a kombináciou údajov z každej pozície vytvára súbor Consensus pre vzorku.

Stanovenia variantov z každého poolu sa do súborov VCF Consensus zlučujú za použitia nasledujúcich kritérií.

Kritériá	Výsledok
Stanovenie referencie v každom poolu	Stanovenie referencie
Stanovenie referencie v 1 poolu a stanovenie variantu v druhom poolu	Filtrované stanovenie variantu
Zodpovedajúce stanovenia variantov s podobnými frekvenciami v každom poolu	Stanovenie variantu
Zodpovedajúce stanovenia variantov so značne odlišnými frekvenciami v každom poolu	Filtrované stanovenie variantu
Nezodpovedajúce stanovenia variantov v každom poolu	Filtrované stanovenie variantu

Metriky z každého poolu sa zlučujú pomocou nasledujúcich hodnôt.

Metrika	Hodnota
Hĺbka	Súčet hĺbok z oboch poolov
Frekvencia variantov	Celkový počet variantov vydelený celkovou hĺbkou pokrytia
Skóre kvality	Minimálna hodnota oboch poolov

## Súbor pokrytia amplikónov

Súbor pokrytia amplikónov sa generuje pre každý súbor manifestu. Mč. v názve súboru predstavuje číslo manifestu

V každom súbore je riadok s hlavičkou, kde sú uvedené ID vzoriek súvisiacich s manifestom. V súbore sú uvedené nasledujúce informácie.

- ▶ Cieľové ID tak, ako je uvedené v manifeste.
- ▶ Hĺbka pokrytia čítaní, ktoré splnili požiadavky filtra.

## Doplnkové súbory s výstupmi

Nasledujúce súbory s výstupmi obsahujú doplňujúce informácie alebo sumarizujú výsledky chodu a chyby analýzy. Hoci sa tieto súbory nevyžadujú na hodnotenie výsledkov analýzy, môžu sa použiť na riešenie problémov. Pokiaľ nie je uvedené inak, všetky súbory sa nachádzajú v priečinku Alignment (Zarovnanie).

Názov súboru	Popis
AnalysisLog.txt	Protokol spracovania, v ktorom sú opísané jednotlivé kroky, ktoré sa vyskytli počas analýzy priečinka aktuálneho chodu. V tomto súbore nie sú uvedené chybové hlásenia. Nachádza sa v priečinku Alignment (Zarovnanie).
AnalysisError.txt	Protokol spracovania, v ktorom sú uvedené všetky chyby, ktoré sa vyskytli počas analýzy. Ak sa nevyskytli žiadne chyby, tento súbor bude prázdny. Nachádza sa v priečinku Alignment (Zarovnanie).
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	Tu sú uvedené výsledky demultiplexovania v tabuľke s 1 riadkom na dlaždicu a 1 stĺpcom na vzorku. Znak # predstavuje pruh 1, 2, 3 alebo 4 prietokovej komôrky. Nachádza sa v priečinku Alignment (Zarovnanie).
AmpliconRunStatistics.xml	Obsahuje štatistické zhrnutie, ktoré je špecifické pre chod. Nachádza sa v priečinku Alignment (Zarovnanie).

## Priečinko analýzy

V priečinku analýzy sa nachádzajú súbory, ktoré vygeneroval softvér Local Run Manager (Správca lokálnych chodov).


Vzťah medzi priečinkom s výstupmi a priečinkom analýzy je zhrnutý takto:

- ▶ Počas sekvenovania zaplní softvér Real-Time Analysis (RTA) priečinko s výstupmi súboru, ktoré sa vygenerovali počas analýzy snímok, stanovenia báz a kvalitatívneho skórovania.
- ▶ Softvér RTA skopíruje súbory do priečinka analýzy v reálnom čase. Po tom, ako softvér RTA priradí skóre kvality každej báze každého cyklu, softvér zapíše súbor RTAComplete.txt do oboch priečinkov.
- ▶ Analýza sa začne vtedy, keď je prítomný súbor RTAComplete.txt.
- ▶ V priebehu analýzy softvér Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) zapisuje súbory s výstupmi do priečinka analýzy a potom kopíruje súbory späť do priečinka s výstupmi.


## Priečinky Alignment (Zarovnanie)

Pri každom opätovnom zaradení analýzy do frontu vytvorí softvér Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) priečinko Alignment (Zarovnanie) s názvom **Alignment\_N**, kde N je poradové číslo.

## Štruktúra priečinkov

 **Alignment** (Zarovnanie) – obsahuje súbory \*.bam, \*.vcf, FASTQ a súbory, ktoré sú špecifické pre analytický modul.

 **Date and Time Stamp** (Označenie dátumu a času) – označenie dátumu a času analýzy vo formáte RRRRMMDD\_HHMMSS

-  AnalysisError.txt
-  AnalysisLog.txt
-  aggregate.report.html
-  aggregate.report.pdf
-  aggregate.summary.csv
-  AmpliconCoverage\_M#.tsv
-  AmpliconRunStatistics.xml
-  Sample1.genome.vcf.gz

- Sample1.coverage.csv
- Sample1.report.pdf
- Sample1.summary.csv
- Sample1.vcf.gz
- Sample1.bam
- FASTQ
  - Sample1 (Vzorka 1)
    - Sample1\_L001\_R1\_001\_fastq.gz
  - Stats (Štatistika)
    - DemuxSummaryF1L1.txt
    - FastqSummaryF1L1.txt
- Data (Údaje)
  - Intensities (Intenzity)
    - BaseCalls (Stanovenie báz)
      - L001 – obsahuje súbory \*.bcl.
      - L001 – obsahuje súbory \*.locs.
    - RTA Logs (Protokoly RTA) – obsahuje súbory protokolov z analýzy softvéru RTA.
  - InterOp – obsahuje binárne súbory slúžiace na nahlasovanie metriky sekvenovacieho chodu.
  - Logs (Protokoly) – obsahuje súbory protokolov opisujúce kroky, ktoré sa vykonali počas sekvenovania.
- RTAComplete.txt
- RunInfo.xml
- RunParameters.xml

## Stanovenie báz a diverzita indexov

Pri sekvenovaní vzoriek v prístroji NextSeq 550Dx sa stanovením báz určuje báza (A, C, G alebo T) každého klastra danej dlaždice alebo snímacej oblasti v prietokovej komôrke v konkrétnom cykle. Prístroj NextSeq 550Dx používa dvojkanálové sekvenovanie, ktoré si na kódovanie údajov štyroch DNA báz vyžaduje len dve snímky: jednu z červeného kanála a druhú zo zeleného kanála.

Proces čítania indexov pri primárnej analýze báz sa odlišuje od stanovenia báz počas iných čítaní.

Čítania indexov sa musia začínať minimálne jednou bázou inou ako G v ktoromkoľvek z prvých dvoch cyklov. Ak sa čítanie indexov začne dvoma stanovenými bázami G, nevygeneruje sa žiadna intenzita signálu. Signál musí byť v ktoromkoľvek z prvých dvoch cyklov prítomný, aby sa zabezpečilo fungovanie demultiplexovania.

Ak indexy nespĺňajú požiadavky na diverzitu, počas výberu indexov pri vytváraní chodu sa zobrazí varovanie týkajúce sa nízkej diverzity. Ak chcete predísť varovaniu týkajúcemu sa nízkej intenzity, vyberte sekvencie indexov, ktoré poskytujú signál v oboch kanáloch pre každý cyklus.

- ▶ Červený kanál – A alebo C
- ▶ Zelený kanál – A alebo T

Tento proces stanovenia báz zabezpečuje správnosť pri analyzovaní malého počtu vzoriek. Viac informácií o sekvenciách vašich indexov nájdete v príbalovom letáku súpravy *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* (dokument č. 1000000029772).

Počas vytvárania chodu v softvéri Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) vyberiete počet vzoriek, ktoré sa majú testovať. Navrhované kombinácie indexov, ktoré spĺňajú požiadavky na diverzitu, automaticky doplní softvér. Hoci nie je použitie navrhovaných kombinácií indexov povinné, odporúča sa.



## História revízií

Dokument	Dátum	Popis zmeny
Dokument č. 1000000030330 v04	August 2021	Aktualizovaná adresa autorizovaného zástupcu EÚ.
Dokument č. 1000000030330 v03	Apríl 2020	Aktualizovaná adresa autorizovaného zástupcu EÚ. Aktualizovaná adresa austrálskeho zadávateľa.
Dokument č. 1000000030330 v02	Január 2019	Pridané informácie o súpravách reagencií v2.5.
Dokument č. 1000000030330 v01	August 2018	Aktualizované regulačné označenia.
Dokument č. 1000000030330 v00	November 2017	Úvodné vydanie.

## Technická pomoc

Technickú pomoc vám poskytne oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.

Webová lokalita: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
E-mail: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

Telefónne čísla oddelenia zákazníckej podpory spoločnosti Illumina

Región	Bezplatné	Regionálne
Severná Amerika	+1.800.809.4566	
Austrália	+1.800.775.688	
Belgicko	+32 80077160	+32 34002973
Čína	400.066.5835	
Dánsko	+45 80820183	+45 89871156
Fínsko	+358 800918363	+358 974790110
Francúzsko	+33 805102193	+33 170770446
Holandsko	+31 8000222493	+31 207132960
Hongkong	800960230	
Írsko	+353 1800936608	+353 016950506
Japonsko	0800.111.5011	
Nemecko	+49 8001014940	+49 8938035677
Nórsko	+47 800 16836	+47 21939693
Nový Zéland	0800.451.650	
Rakúsko	+43 800006249	+43 19286540
Singapur	+1.800.579.2745	
Spojené kráľovstvo	+44 8000126019	+44 2073057197
Španielsko	+34 911899417	+34 800300143
Švajčiarsko	+41 565800000	+41 800200442
Švédsko	+46 850619671	+46 200883979
Taiwan	00806651752	
Taliansko	+39 800985513	+39 236003759
Ostatné krajiny	+44 1799 534000	

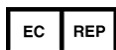
Karty bezpečnostných údajov (Safety data sheets, SDS) – k dispozícii na webovej lokalite spoločnosti Illumina na stránke [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

Produktová dokumentácia – k dispozícii na prevzatie vo formáte PDF z webovej lokality spoločnosti Illumina. Prejdite na stránku [support.illumina.com](http://support.illumina.com), vyberte produkt a potom položku **Documentation & Literature** (Dokumentácia a literatúra).



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122  
U.S.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (okrem Severnej  
Ameriky)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



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

**Austrálsky zadávateľ**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Austrália

**NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY I N VITRO**

© 2021 I Illumina, I nc. Všetky práva vyhradené.

**illumina®**