

# Prístroj NextSeq™ 550Dx

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

IBA NA EXPORT

Katalógové číslo 20005715

## Účel použitia

Prístroj NextSeq 550Dx je určený na sekvenčné spracovanie knižníc DNA počas použitia s *in vitro* diagnostickými analýzami. Prístroj NextSeq 550Dx je určený na používanie so špecifickými registrovanými, certifikovanými alebo schválenými *in vitro* diagnostickými reagensiami a analytickým softvérom.

## Zásady postupu

Prístroj Illumina NextSeq 550Dx je určený na sekvenčné spracovanie knižníc DNA pomocou *in vitro* diagnostických analýz. Je určený na používanie kvalifikovaným a vyškoleným klinickým laboratórnym personálom, ktorý bol vyškolený v oblasti používania *in vitro* diagnostických postupov vykonávaných v klinickom laboratóriu. Prístroj NextSeq 550Dx používa ako vstup knižnicu vytvorenú z DNA, kde sa indexy vzoriek a sekvencie zachytenia pridávajú k amplifikovaným cieľom. Knižnice vzoriek sa zachytávajú na prietokovom článku a sekvenčne sa spracujú v prístroji pomocou biochemického sekvenčného syntetického spracovania (SBS). Biochemická technológia SBS pomocou metódy reverzibilného terminátora (koncového činiteľa) deteguje fluorescenčne označené bázy s jedným nukleotidom počas ich začleňovania do rastúceho reťazca DNA. Softvér Real-Time Analysis (RTA) vykonáva analýzu obrazu a volanie bázy a ku každej báze za každý cyklus sekvenčného spracovania priradí kvalitatívne skóre. Po dokončení primárnej analýzy je v prístroji možné spustiť sekundárnu analýzu na spracovanie volaní bázy. Prístroj NextSeq 550Dx využíva v závislosti od pracovného toku rôzne moduly sekundárnej analýzy. V prípade modulov Germline alebo Somatic Variant spracovanie zahŕňa demultiplexáciu, generovanie súboru FASTQ, zarovnanie, volanie variantu a generovanie súborov formátu volania variantu (VCF a gVCF). Súbory VCF a gVCF obsahujú informácie o nájdených variantoch na špecifických pozíciách v referenčnom génome.

## Konfigurácia dvojitého zavedenia

Zariadenie NextSeq 550Dx ponúka možnosť konfigurácie dvojitého zavedenia, vďaka ktorému je prístroj možné používať v diagnostickom (Dx) alebo vyhradenom výskumnom (RUO) režime. Diagnostické sekvenčné analýzy *in vitro* vrátane modulov Germline a Somatic Variant sa vykonávajú v diagnostickom režime. V diagnostickom režime je možné použiť iba reagensie na sekvenčné spracovanie IVD. Charakteristiky účinnosti a obmedzenia procedúry pre prístroj NextSeq 550Dx boli vytvorené pomocou modulov Germline a Somatic Variant v diagnostickom režime.

## Obmedzenia postupu

- 1 Na diagnostické účely *in vitro*.
- 2 Moduly Germline a Somatic Variant v prípade ich používania so súpravou reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) alebo súpravou reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) dokážu generovať nasledujúce výstupy:
  - ▶ Výstup sekvenčného spracovania  $\geq 90$  gigabáz (Gb)
  - ▶ Dĺžka načítania (v cykle so spárovaným koncom)  $2 \times 150$  bázických párov (bp)
  - ▶ Bázy rovnajúce sa alebo väčšie než Q30  $\geq 75$  % pri dĺžke načítania  $2 \times 150$  bp

- 75 % alebo viac spomedzi báz dosiahlo skóre kvality Phredovej stupnice  $\geq 30$ , čo indikuje správnosť volaní bázy vyššiu než 99,9 %
- 3 Testovací softvér nezarovnáva čítania s indelmi (zavedeniami, deléciami alebo kombináciami) vtedy, ak je dĺžka obsahu  $> 25$  bp. V dôsledku toho testovací softvér nedokáže detegovať indely s dĺžkou  $> 25$  bp.
  - 4 Testovací softvér nemôže zarovnávať načítania amplikónov s extrémnym variantným obsahom, v dôsledku čoho sa oblasť vykáže ako štandardná. Takýto extrémny obsah zahŕňa:
    - ▶ Čítania obsahujúce viac ako tri indely.
    - ▶ Čítania s dĺžkou aspoň 30 bp s obsahom jednonukleotidového variantu (SNV)  $> 4$  % celkovej cieľovej dĺžky amplikónu (okrem oblasti prób).
    - ▶ Čítania s dĺžkou  $< 30$  bp s obsahom SNV  $> 10$  % celkovej dĺžky amplikónu (vrátane oblasti prób).
  - 5 Veľké varianty vrátane multikleotidových variantov (MNV) a veľkých indelov sa môžu vo výstupnom súbore VCF vykazovať ako samostatné menšie varianty.
  - 6 Varianty delécií sa môžu pri premostení dvoch prekrývajúcich sa amplikónov filtrovať alebo vynechať, ak je dĺžka delécie rovná prekrytiu medzi prekrývajúcimi sa amplikónmi alebo väčšia ako toto prekrytie.
  - 7 Ak sa indely nachádzajú tesne vedľa priméru a chýba prekrývajúci sa amplikón, systém nedokáže tieto indely detegovať. V prípade oblastí s prekrývajúcimi sa amplikónmi test nedokáže detegovať delécie, ak je oblasť prekrytia menšia ako veľkosť delécie, ktorá sa má detegovať. Napríklad ak oblasť prekrytia medzi dvoma susediacimi amplikónmi tvoria dve bázy, test nedokáže detegovať žiadne delécie zahŕňajúce obe tieto bázy. Deléciu jednej bázy v ktorejkoľvek z týchto báz je možné detegovať.
  - 8 Rovnako ako pri inom pracovnom postupe prípravy knižnice na báze hybridizácie môžu základné polymorfizmy, mutácie, zavedenia alebo delécie v oligonukleotických väzbových oblastiach ovplyvňovať alely, na ktoré sa zameriava sonda, a volania vykonané počas sekvenovania. Príklad:
    - ▶ Variant vo fáze s variantom v oblasti priméru sa nemusí amplifikovať, v dôsledku čoho sa získa falošne negatívny výsledok.
    - ▶ Varianty v oblasti priméru by mohli zabrániť amplifikácii referenčnej alely, v dôsledku čoho by sa nesprávne stanovil homozygotný variant.
    - ▶ Varianty indelov v oblasti priméru môžu spôsobovať falošne pozitívne stanovenie na konci čítania susediaceho s primérom.
  - 9 Ak sa indely nachádzajú v blízkosti konca jedného čítania a sú počas zarovnania tzv. soft-clipped (mierne zastrihnuté), tieto indely sa môžu filtrovať v dôsledku odchýlky vlákna.
  - 10 Malé MNV neboli validované a vykazujú sa len v module Somatic Variant.
  - 11 Delécie sa vo VCF vykážu na súradnici predchádzajúcej bázy podľa formátu VCF. Preto v prípade susediacich variantov treba pred vykazovaním zvážiť, či je jednotlivé volanie bázy homozygotnou referenciou.
  - 12 Obmedzenia špecifické pre modul Germline:
    - ▶ Prístroj NextSeq 550Dx používajúci modul Germline Variant softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov) prístroja NextSeq 550Dx je určený na poskytovanie kvalitatívnych výsledkov na stanovenie germinálnych variantov (napr. homozygotných, heterozygotných, divokého typu).
    - ▶ Ak sa používa s modulom Germline Variant, minimálne pokrytie na amplikón potrebné na presné stanovenie variantov je 150x. V dôsledku toho sa vyžaduje 150 podporných fragmentov DNA, čo zodpovedá 300 prekrývajúcim sa čítaniam z oboch koncov. Na pokrytie má vplyv počet vzoriek a celkový počet cieľových báz. Obsah GC a ďalší genomický obsah môže ovplyvňovať pokrytie.
    - ▶ Variácia v počte kópií môže ovplyvniť to, či sa variant identifikuje ako homozygotný alebo heterozygotný.
    - ▶ Varianty v určitom repetitívnom kontexte sa v súboroch VCF odfiltrujú. Ak sa celá sekvencia variantu alebo jej časť nachádza opakovane v referenčnom genóme vedľa pozície variantu, na filtrovanie variantov sa použije filter opakovania RMxN. V prípade volania variantu Germline sa na filtrovanie variantu vyžaduje minimálne deväť opakovaní v referencii. Zohľadňujú sa iba opakovania s dĺžkou do 5 bp (R5x9).
    - ▶ Ak sa na jednom mieste nachádzajú indel a SNV, môže to viesť k vykázaniu iba jedného variantu.
  - 13 Obmedzenia špecifické pre modul Somatic.
    - ▶ Prístroj NextSeq 550Dx používajúci modul Somatic Variant softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych

cyklov) prístroja NextSeq 550Dx je určený na poskytovanie kvalitatívnych výsledkov na volanie somatických variantov (napr. prítomnosť somatického variantu s variantnou frekvenciou rovnajúcou sa alebo vyššou ako 0,026 s detekčným limitom 0,05).

- ▶ Ak sa používa modul Somatic Variant, minimálne pokrytie na amplicón potrebné na presné stanovenie variantov je 450x na pool oligonukleotidov. V dôsledku toho sa vyžaduje 450 podporných fragmentov DNA na pool oligonukleotidov, čo zodpovedá 900 prekrývajúcim sa čítaniam z oboch koncov. Na pokrytie má vplyv počet vzoriek a celkový počet cieľových báz. Obsah GC a ďalší genomický obsah môže ovplyvňovať pokrytie.
- ▶ V prípade stanovenia somatických variantov sa na filtrovanie variantu vyžaduje minimálne šesť opakovaní v referencii a zohľadňujú sa len opakovania s dĺžkou do 3 bp (R3x6).
- ▶ Modul Somatic Variant nedokáže rozlišovať medzi germinálnymi a somatickými variantmi. Modul je určený na detekciu variantov v celom rozsahu frekvencií variantov, frekvenciu variantov však nie je možné použiť na odlišenie somatických variantov od germinálnych variantov.
- ▶ Normálne tkanivo vo vzorke ovplyvňuje detekciu variantov. Vykazovaný limit detekcie je založený na frekvencii variantov vzhľadom na celkovú DNA extrahovanú z nádorového aj normálneho tkaniva.

## Komponenty produktu

- 1 Prístroj NextSeq 550Dx (katalógové číslo 20005715)
- 2 Softvérové súčasti prístroja NextSeq 550Dx vrátane nasledujúcich súčastí:

Softvérová aplikácia	Funkcia	Opis
Operačný softvér NextSeq 550Dx (NOS)	Slúži na ovládanie prevádzky prístroja	Softvérová aplikácia NOS slúži na správu používania prístroja počas sekvenčného spracovania a generuje obrázky na použitie softvérom Real-Time Analysis (RTA).
Softvér Real-Time Analysis (RTA)	Slúži na vykonávanie primárnej analýzy	Softvérová aplikácia RTA konvertuje obrázky generované systémom NOS pre každú dlaždicu na každý cyklus sekvenčného spracovania na súbory volania bázy, ktoré slúžia ako vstupy pre analytické moduly aplikácie Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov). Softvérová aplikácia RTA neobsahuje používateľské rozhranie.
Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov)	Rozhranie na výber modulov	Softvér Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov) je integrované riešenie v prístroji na správu používateľov, výber vhodného analytického modulu a monitorovanie stavu.
Modul Somatic Variant	Slúži na vykonávanie sekundárnej analýzy	Softvér analytického modulu Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov) slúži na spracovanie volaní bázy prostredníctvom sekundárnej analýzy. Takéto spracovanie zahŕňa demultiplexáciu, generovanie súboru FASTQ, zarovnanie, volanie variantu a vykazovanie. Nástroj na volanie variantov (Pisces) generuje súbory VCF obsahujúce informácie o variantoch na špecifických pozíciách v referenčnom génome a zahŕňa odmeranú frekvenciu variantu.
Modul Germline Variant	Slúži na vykonávanie sekundárnej analýzy	Softvér analytického modulu Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov) slúži na spracovanie volaní bázy prostredníctvom sekundárnej analýzy. Takéto spracovanie zahŕňa demultiplexáciu, generovanie súboru FASTQ, zarovnanie, volanie variantu a vykazovanie. Nástroj na volanie variantov (Pisces) generuje súbory VCF obsahujúce informácie o variantoch na špecifických pozíciách v referenčnom génome a identifikuje každý variant ako heterozygotný alebo homozygotný.

## Prevádzkové podmienky

Prvok	Špecifikácia
Teplota	V laboratóriu uchovávajte teplotu 19 °C až 25 °C (22 °C ±3 °C). Toto je prevádzková teplota prístroja. Počas prevádzky nedovoľte zmenu teploty prostredia o viac ako ±2 °C.
Vlhkosť	Udržujte nekondenzujúcu relatívnu vlhkosť v rozmedzí 20 – 80 %.

## Vybavenie a materiály

### Požadované vybavenie a materiály, ktoré sa predávajú samostatne

Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklov), katalógové číslo 20028870

Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov), katalógové číslo 20028871

### Požadované, ale nedodávané vybavenie a materiály

#### Spotrebný materiál na sekvenovacie chody dodávaný používateľom

Spotrebný materiál	Dodávateľ	Účel
Alkoholové utierky, 70 % izopropyl alebo 70 % etanol	VWR, katalógové č. 95041-714 (alebo ekvivalent) Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Čistenie prietokového článku a všeobecné použitie.
Laboratórna tkanina bez vlákien	VWR, katalógové č. 21905-026 (alebo ekvivalent)	Čistenie prietokového článku a všeobecné použitie.

#### Spotrebný materiál na údržbu prístroja dodávaný používateľom

Spotrebný materiál	Dodávateľ	Účel
NaOCl, 5 % (chlórnan sodný)	Sigma-Aldrich, katalógové č. 239305 (alebo laboratórny ekvivalent)	Prepláchnutie prístroja pomocou manuálneho prepláchnutia po ukončení chodu; zriedený na 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalógové č. P7949	Prepláchnutie prístroja pomocou možností manuálneho prepláchnutia; zriedený na 0,05 %
Laboratórna voda	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Prepláchnutie prístroja (manuálne prepláchnutie)
Vzduchový filter	Illumina, katalógové č. 20022240	Čistenie vzduchu, ktorý prístroj nasáva na účely chladenia

#### Usmernenia pre laboratórnu vodu

Na vykonávanie postupov na prístroji vždy používajte laboratórnu alebo deionizovanú vodu. Nikdy nepoužívajte kohútikovú vodu. Používajte len tieto stupne vody alebo ich ekvivalenty:

- ▶ Deionizovaná voda
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Voda s odporom 18 megaohmov
- ▶ Voda Milli-Q
- ▶ Voda Super-Q
- ▶ Voda na molekulárnu biológiu

## Varovania a preventívne opatrenia

**UPOZORNENIE** Federálne zákony obmedzujú predaj, objednanie, používanie alebo objednanie používania tohto zariadenia na lekára alebo iného odborníka s licenciou podľa práva štátu, v ktorom vykonáva prax.

- 1 Niektoré komponenty reagensí poskytované spoločnosťou Illumina na použitie s prístrojom NextSeq 550Dx obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho plášťa, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagentmi manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Ihneď nahláste akékoľvek závažné udalosti spojené s týmto výrobkom spoločnosti Illumina a príslušným úradom v členskom štáte, v ktorom sa nachádzajú používateľ aj pacient.
- 3 So všetkými krvnými vzorkami zaobchádzajte ako s infekčným materiálom obsahujúcim vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), vírus ľudskej hepatitídy B (HBV) a iné krvou prenášané patogény (univerzálne preventívne opatrenia).
- 4 Nedodržiavanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality vzoriek.
- 5 Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensiami zo súpravy používajte jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensiami zo súpravy si dôkladne umyte ruky.
- 6 Dodržiavajte správne laboratórne postupy a dobrú laboratórnu hygienu, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, nástrojov a genomických vzoriek DNA produktmi PCR. Kontaminácia spôsobená PCR môže zapríčiniť nepresné a nespoľahlivé výsledky.
- 7 Aby nedošlo ku kontaminácii, priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii musia mať špecializované vybavenie a spotrebný materiál (napríklad pipety, špičky pipiet, mixéry a odstredivky).
- 8 Index na párovanie vzoriek sa musí presne zhodovať s vytlačeným rozložením plošiny. Softvér Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov) automaticky vyplní indexovacie priméry priradené k názvom vzoriek po zadaní do modulu. Pred začatím cyklu sekvenčného spracovania odporúčame, aby používateľ overil priradenie indexovacích primérov ku vzorkám. Nezhoda medzi vzorkami a rozložením plošiny vedie k strate identifikácie pozitívnej vzorky a k nesprávnemu vykazovaniu výsledkov.
- 9 Na ochranu počítača pred vírusmi odporúčame inštalovať používateľom zabezpečený antivírusový softvér. Pokyny na inštaláciu nájdete v používateľskej príručke.
- 10 Ak je odpojený akýkoľvek panel, prístroj NextSeq 550Dx nepoužívajte. Ak bol ktorýkoľvek z panelov odstránený, pri použití prístroja vzniká riziko potenciálneho vystavenia sieťovému napätiu a jednosmernému napätiu.
- 11 Nedotýkajte sa plošiny prietokového článku v priestore na prietokový článok. Teplota ohrievača v tomto priestore dosahuje 22 °C až 95 °C – hrozí riziko popálenia.
- 12 Hmotnosť prístroja je približne 185 libier a ak spadne alebo sa s ním nesprávne manipuluje, môže spôsobiť vážne poranenie.

## Návod na použitie

Nasledujúci návod na použitie sa vzťahuje na používanie modulov Germline a Somatic Variant Modules v diagnostickom režime v prístroji NextSeq 550Dx použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) alebo súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

## Zadanie informácií o cykle

Podrobné pokyny nájdete v referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (číslo dokumentu 100000009513) a v príslušnej príručke k modulu Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov).

## Nastavenie parametrov

- 1 Prihláste sa do aplikácie Local Run Manager (Správca lokálnych chodov).
- 2 Vyberte možnosť **Create Run** (Vytvoriť chod) a následne možnosť modulu **Somatic Variant** (Somatický variant) alebo **Germline Variant** (Germinálny variant).

- 3 Zadať názov chodu, ktorým sa chod počas analýzy odliši od sekvenovania.  
Použite alfanumerické znaky, medzery, podčiaričky alebo pomlčky.
- 4 **[Voliteľné]** Na zjednodušenie identifikácie chodu zadajte opis chodu.  
Použite alfanumerické znaky, medzery, podčiaričky alebo pomlčky.
- 5 V rozbaľovacej ponuke vyberte počet vzoriek a skupinu indexov.  
Pri výbere zvážte tieto informácie.
  - ▶ Rozbaľovací zoznam obsahuje počty vzoriek so skupinou indexov. Napríklad položka 24-Set 1 určuje, že sa bude testovať 24 vzoriek a použijú sa indexy zo skupiny indexov 1.
  - ▶ Čísla skupiny indexov odkazujú na rôzne skupiny párov indexov i5 a i7. Skupina 1 aj skupina 2 poskytujú rôzne indexy. Dve skupiny indexov sa ponúkajú preto, aby sa zabránilo vyčerpaniu jednej skupiny.
  - ▶ Vyberte taký počet vzoriek, aký sa čo najviac približuje počtu vami testovaných vzoriek. Ak sa v zozname nenachádza presný počet vzoriek, vyberte najbližší počet, ale nižší ako ten počet, ktorý testujete. Ak, napríklad, chcete testovať 18 vzoriek, vyberte počet 16.
  - ▶ Navrhované kombinácie jamiek na vzorky a indexov, ktoré spĺňajú požiadavky rozdielnosti indexov, sú označené zelenou farbou.

#### Import súborov manifestu pre cyklus

- 1 Overte, či sú manifesty, ktoré chcete importovať, dostupné v prístupnom sieťovom umiestnení alebo na jednotke USB.
- 2 Vyberte položku **Import Manifests** (Importovať manifesty).
- 3 Prejdite na súbor manifestu a vyberte manifesty, ktoré chcete pridať.

**POZNÁMKA** Ak chcete sprístupniť súbory manifestu pre všetky chody pomocou analytického modulu Germline Variant alebo Somatic Variant, pridajte manifesty použitím funkcie Module Settings (Nastavenia modulu). Táto funkcia vyžaduje povolenia na úrovni správcu. Viac informácií nájdete v *Referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.


#### Stanovenie vzoriek pre cyklus

Pomocou niektorej z nižšie uvedených možností a pokynov stanovte vzorky pre cyklus.


- ▶ **Vzorky zadajte manuálne** – použite prázdnu tabuľku na obrazovke Create Run (Vytvorenie cyklu).
- ▶ **Importujte vzorky** – prejdite do externého súboru vo formáte hodnôt oddelených čiarkou (\*.csv). Na obrazovke Create Run (Vytvorenie cyklu) bude k dispozícii šablóna na stiahnutie.

#### Manuálne zadanie vzoriek

- 1 Zadať jedinečný názov vzorky (**analytický modul Somatic Variant**) alebo identifikáciu vzorky (**analytický modul Germline Variant**).  
Použite alfanumerické znaky, pomlčky alebo podčiaričky.
- 2 **[Voliteľné]** V prípade pozitívnych alebo negatívnych kontrolných vzoriek kliknite pravým tlačidlom myši a vyberte typ kontroly.  
Kontrola v jednej jamke na vzorku automaticky vyplní rovnakú kontrolu v príslušnej jamke v ďalšom poole.
- 3 **[Voliteľné]** Do poľa Sample Description (Opis vzorky) zadajte opis vzorky.  
Použite alfanumerické znaky, pomlčky alebo podčiaričky.
- 4 Vyberte adaptér indexu 1 v rozbaľovacom zozname Index 1 (i7) (Index 1).  
Keď používate navrhované jamky na vzorky, softvér automaticky vyplní tie adaptéry indexov i7 a i5, ktoré spĺňajú požiadavky na odlišnosť indexov. Ak presný počet vzoriek, ktoré testujete, nie je uvedený v zozname, nezabudnite vybrať adaptéry indexov pre dodatočné jamky.
- 5 Vyberte adaptér indexu 2 v rozbaľovacom zozname Index 2 (i5) (Index 2).
- 6 Vyberte súbor manifestu v rozbaľovacom zozname Manifest (Manifest).  
Vzorky v poole A vyžadujú odlišný manifest než vzorky v poole B.
- 7 Vyberte možnosť zobrazenia, tlačte alebo uloženia rozloženia doštičky ako referencie na prípravu knižnic:

- Ak chcete zobrazíť rozloženie doštičky, vyberte ikonu  **Print** (Tlačiť). Na vytlačenie rozloženia doštičky vyberte možnosť **Print** (Tlačiť).
  - Na exportovanie informácií o vzorke do externého súboru vyberte položku **Export** (Exportovať).
- 8 Vyberte možnosť **Save Run** (Uložiť chod).

#### Import vzoriek

- 1 Vyberte možnosť **Import Samples** (Importovať vzorky) a vyberte miesto, kde je uložený súbor informácií o vzorke. Existujú dva typy súborov, ktoré môžete importovať:
  - Ak chcete vytvoríť nové rozloženie doštičky, vyberte možnosť **Template** (Šablóna) na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu). Súbor šablóny obsahuje správne hlavičky stĺpcov na import. Zadáajte informácie o vzorke do každého stĺpca pre vzorky v cykle. Odstráňte vzorové informácie v nepoužívaných bunkách a súbor uložte.
  - Použite súbor s informáciami o vzorke, ktorý sa exportoval z modulu Germline Variant alebo Somatic Variant pomocou funkcie Export (Exportovať).
- 2 Ak chcete zobrazíť rozloženie doštičky, vyberte ikonu  **Print** (Tlačiť).
- 3 Ak chcete tlačiť rozloženie doštičky ako referenciu na prípravu knižníc, vyberte položku **Print** (Tlačiť).
- 4 Vyberte možnosť **Save Run** (Uložiť chod).

## Príprava kazety s reagensiami

Úspešné sekvenovanie je podmienené dôsledným dodržiavaním pokynov týkajúcich sa kazety s reagensiami.

- 1 Vyberte kazetu s reagensiami z miesta uskladnenia s teplotou od  $-25^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Rozmrazenie reagensii vykonajte pomocou jednej z nasledujúcich metód. Kazetu neponárajte. Kazetu po rozmrazení najprv osušte a až potom prejdite na ďalší krok.

Teplota	Čas rozmrazenia	Medza stability
Vodný kúpeľ s teplotou $15^{\circ}\text{C}$ až $30^{\circ}\text{C}$	60 minút	Neprekračujte 6 hod.
$2^{\circ}\text{C}$ až $8^{\circ}\text{C}$	7 hodín	Neprekračujte 5 dní

**POZNÁMKA** Ak sa v jednom vodnom kúpeli rozmrazuje viacero kaziet, nechajte ich rozmrazovať dlhšie.

- 3 Kazetu päťkrát prevráťte, aby ste zmiešali reagensie.
- 4 Kontrolou spodnej časti kazety sa presvedčte, či sú reagensie rozmrazené a či sa v nich nenachádzajú zrazeniny. Presvedčte sa, či sú pozície 29, 30, 31 a 32 rozmrazené, keďže sú najväčšie a ich rozmrazenie trvá najdlhšie.
- 5 Jemným poklepaním o stôl zmenšíte množstvo vzduchových bubliniek. Najlepšie výsledky sa dosiahnu vtedy, keď sa prejde priamo na načítanie vzorky a nastavenie chodu.

## Príprava prietokového článku

- 1 Vyberte škatuľu s novým prietokovým článkom z miesta jeho uchovávania pri teplote  $2^{\circ}\text{C}$  až  $8^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Zo škatule odstráňte fóliový obal a nechajte ju postáť pri izbovej teplote 30 minút.

## Príprava knižníc na sekvenovanie

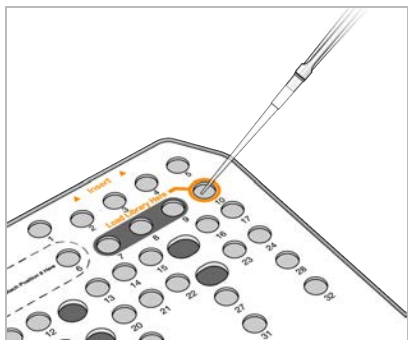
Knižnice denaturujte a zriedte na objem nanášania 1,3 ml. Koncentrácia nanášania sa v skutočnosti môže líšiť v závislosti od prípravy knižnice a kvantifikačných metód. Zriadenie knižníc vzoriek závisí od zložitosti oligonukleotidových skupín (pool). Pokyny na prípravu knižníc vzoriek na sekvenovanie vrátane zriedovania a združovania (pooling) knižníc nájdete v návode na použitie v oddieli pojednávajúcom o súprave na prípravu knižnice, ktorá sa má použiť. Hustotu klastrov v prístroji NextSeq 550Dx je potrebné optimalizovať.

## Vloženie knižníc do kazety s reagensiami

- 1 Tkaninou bez vlákien vyčistite fóliové tesnenie pokrývajúce zásobník č.10 s označením **Load Library Here** (Sem vložiť knižnicu).

- 2 Tesnenie prepichnete čistou špičkou 1 ml pipety.
- 3 Vložte 1,3 ml pripravených knižníc do zásobníka č. 10 s označením **Load Library Here** (Sem vložte knižnicu). Pri rozptyľovaní knižníc sa nedotýkajte fóliového tesnenia.

Obrázok 1 Vloženie knižníc



## Nastavenie cyklu sekvenčného spracovania

- 1 Prihláste sa do prístroja NextSeq 550Dx pomocou hesla v softvéri Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov).
- 2 Na domovskej obrazovke softvéru NOS vyberte možnosť **Sequence** (Sekvenčne spracovať).
- 3 V zozname vyberte cyklus a potom vyberte položku **Next** (Ďalej).  
Otvoria sa obrazovky s nastavením cyklu v nasledujúcom poradí: Load Flow Cell (Vloženie prietokového článku), Load Buffer Cartridge (Vloženie kazety s pufrom), Load Reagent Cartridge (Vloženie kazety s reagensiou) a Pre-run Check (Kontrola pred spustením cyklu).
- 4 Keď sa zobrazí obrazovka Load Flow Cell (Vloženie prietokového článku), vyčistite a vložte prietokový článok.
  - ▶ Vytiahnite prietokový článok z fóliového obalu.
  - ▶ Otvorte priehľadný plastový uzatvárací obal a vytiahnite prietokový článok.
  - ▶ Sklený povrch prietokového článku vyčistite obrúskom nezanechávajúcim vlákna navlhčeným v alkohole. Sklo osušte laboratórnou tkaninou nezanechávajúcou vlákna.
  - ▶ Presvedčte sa, či je sklený povrch prietokového článku čistý. V prípade potreby čistenie zopakujte.
  - ▶ Odpojte použitý prietokový článok z predchádzajúceho cyklu.
  - ▶ Prietokový článok zarovnajte nad zarovnávacími kolíkmi a umiestnite ho na plošinu.
- 5 Vyberte položku **Load** (Vložiť).  
Dvierka sa automaticky zatvoria, na obrazovke sa zobrazí ID prietokového článku a skontrolujú sa snímače.
- 6 Podľa softvérových výziev vyprázdňte nádobu na použité reagensie, vložte kazetu s pufrom NextSeq 550Dx a vložte kazetu s reagensiou NextSeq 550Dx.  
Po vložení kaziet s pufrom a reagensiou NextSeq 550Dx softvér načíta a zaznamená identifikáciu RFID. Identifikácie kaziet s pufrom a reagensiou sa zobrazia na obrazovke a skontrolujú sa snímače.
- 7 Po dokončení kontroly pred spustením cyklu vyberte možnosť **Start** (Spustiť). (Tento krok nie je potrebný, ak je systém nakonfigurovaný na automatické spustenie.)
- 8 Po spustení cyklu sa zobrazí obrazovka Sequencing (Sekvenčné spracovanie). Na tejto obrazovke sa zobrazuje vizuálne znázornenie prebiehajúceho cyklu vrátane intenzít a skóre kvality (skóre Q).

## Výsledky

Softvér Real-Time Analysis (RTA) je integrovaný softvér, ktorý vykonáva analýzu obrazu a volanie bázy a ku každej báze za každý cyklus sekvenčného spracovania priradí kvalitatívne skóre. Po dokončení primárnej analýzy vybratý modul Local Run Manager (Správca lokálnych cyklov) v prístroji NextSeq 550Dx automaticky spustí sekundárnu analýzu. Tu uvádzané procesy sekundárnej analýzy sa vzťahujú na moduly Germline a Somatic Variant.



## Demultiplexácia

Demultiplexácia slúži na porovnanie každej sekvencie načítania indexu so sekvenciami indexu určenými v cykle. V rámci tohto kroku sa nezohľadňujú žiadne kvalitatívne hodnoty.

Identifikácia načítania indexov prebieha podľa nasledujúcich krokov:

- ▶ Vzorky sú očíslované počnúc číslom 1 podľa poradia, v ktorom sú pre daný cyklus uvádzané.
- ▶ Číslo vzorky 0 je vyhradené pre klastre, ktoré neboli priradené k vzorke.
- ▶ Klastre sa priradujú k vzorke vtedy, keď sa sekvencia indexu presne zhoduje, alebo vtedy, ak načítanie indexu vykazuje max. jednu nezhodu.

## Generovanie súboru FASTQ

Po dokončení demultiplexácie softvér generuje „medzianalytické“ súbory vo formáte FASTQ, t. j. v textovom formáte, ktorý sa používa na vyjadrenie sekvencií. Súbory FASTQ obsahujú čítania pre každú vzorku a súvisiace kvalitatívne skóre. Klastre, ktoré neprejdú filtrovaním, sa vyradia.

Každý súbor FASTQ obsahuje čítania iba pre jednu vzorku a názov danej vzorky sa zahmie do názvu súboru FASTQ. V moduloch Germline a Somatic Variant sa na jeden pool oligonukleotidov generuje osem súborov FASTQ na jednu vzorku – štyri z čítania 1 a štyri z čítania 2. Výsledkom tohto výstupu je celkom 8 a 16 súborov FASTQ na jednu vzorku pre moduly Germline a Somatic. Súbory FASTQ sú primárnym vstupom na zarovnanie.

## Zarovnanie

Počas kroku zarovnania zarovnáva pruhový Smithov-Watermanov algoritmus klastre z každej vzorky vzhľadom na sekvencie amplikóna stanovené v súbore manifestu.

Pruhový Smithov-Watermanov algoritmus vykonáva semiglobálne zarovnania sekvencií na účely určenia podobných oblastí medzi dvoma sekvenciami. Namiesto porovnania celkovej sekvencie Smithov-Watermanov algoritmus porovnáva segmenty všetkých možných dĺžok.

Každé čítanie s párovým koncom sa hodnotí z hľadiska jeho zarovnania so sekvenciami príslušnej sondy pre dané čítanie.

- ▶ Čítanie 1 sa porovnáva s reverzným doplnkom downstreamových oligonukleotidov špecifických pre dané miesto (DLSO, Downstream Locus-Specific Oligos).
- ▶ Čítanie 2 sa porovnáva s upstreamovými oligonukleotidmi špecifickými pre dané miesto (ULSO, Upstream Locus-Specific Oligos).
- ▶ Ak sa začiatok čítania zhoduje so sekvenciou sondy s max. jednou nezhodou, s cieľovým amplikónom pre danú sekvenciu sa zarovná celá dĺžka čítania.
- ▶ Ak sa začiatok čítania zhoduje so sekvenciou sondy s nie viac ako tromi rozdielmi (nezhody alebo posuny v dôsledku úvodných indelov), s cieľovým amplikónom pre danú sekvenciu sa zarovná celá dĺžka čítania.
- ▶ Indely v rámci DLSO a ULSO nie sú vzhľadom na biochemické vlastnosti analýzy pozorované.

Zarovnania sa odfiltrujú z výsledkov zarovnania na základe miery výskytu nezhôd buď v celej oblasti, alebo v celom amplikóne (v závislosti od dĺžky amplikóna). Filtrované zarovnania sa zaznamenávajú do súborov zarovnania ako nezarovnané a nepoužijú sa na volanie variantu.

## Volanie variantu

Nástroj na volanie variantov PISCES slúži na realizáciu volaní variantov SNV a indel z knižníc pripravených pre prístroj.

## Výsledky a ďalšie výstupné súbory

Moduly analýzy variantov generujú správy vo formáte PDF a v tabulátorom oddelenom formáte (\*.txt), ktoré uvádzajú metriky, ako napríklad hĺbku sekvenčného spracovania a počty variantov. Tieto moduly taktiež generujú výstupné súbory typu VCF a súbory volania genomického variantu (gVCF) pre aplikácie volaní variantu.

## Postupy kontroly kvality

Softvér NextSeq 550Dx hodnotí každý cyklus, vzorku a volanie bázy podľa metriky kontroly kvality. Pozitívne a negatívne kontroly sú počas prípravy knižnice taktiež odporúčané a je potrebné ich zhodnotiť. Hodnotenie kontrol vykonajte podľa nasledujúceho postupu:

- **Negatívna kontrola (kontrola bez šablóny) alebo iná negatívna kontrola** – musí generovať očakávaný výsledok. Ak negatívna kontrola generuje výsledok odlišný od očakávaného výsledku, vyskytla sa pravdepodobná chyba sledovania vzorky, nesprávny záznam indexovacích primérov alebo došlo ku kontaminácii.
- **Pozitívna kontrolná vzorka** – musí generovať očakávaný výsledok. Ak pozitívna kontrola generuje výsledok odlišný od očakávaného výsledku, vyskytla sa pravdepodobná chyba sledovania vzorky alebo nesprávneho záznamu indexovacích primérov.

## Charakteristiky účinnosti

Charakteristiky účinnosti prístroja NextSeq 550Dx boli vytvorené použitím modulov Germline a Somatic Variant so súpravou TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov), a overené použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Štúdie zahŕňali indexovanie vzoriek, prenos vzoriek, vstup DNA, analytickú citlivosť (limit blanku/detekčný limit), správnosť, presnosť, porovnanie metód a reprodukovateľnosť.

Analytické štúdie využívajúce súpravu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) boli určené na hodnotenie charakteristík účinnosti, ktoré boli predtým vytvorené použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Výsledky preukazujú, že súpravy reagensí (v2 a v2.5) majú porovnateľnú účinnosť pri použití súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Prečítajte si *príbalový leták k súprave TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*, v ktorom nájdete informácie o charakteristikách účinnosti týkajúcich sa predanalytických faktorov (napríklad metódy extrakcie alebo rušivé látky).

## Definície výpočtov použitých v rámci charakteristík účinnosti

- 1 Pozitívna percentuálna zhoda (PPA) sa počíta ako pomer miest klasifikovaných ako varianty podľa referenčnej metódy, ktoré analýza správne vykáže.
  - ▶  $(\text{počet variantných miest správne vykazovaných analýzou}) / (\text{celkový počet variantných miest})$   
Variantné miesta vykazované analýzou, ktoré sa zhodujú (sú konkordantné) s referenčnou metódou, sú pravdivo pozitívne (TP). Variantné miesta vykazované analýzou ako referenčné volania alebo ako odlišné variantné volania sú nepravdivo negatívne (FN).
- 2 Negatívna percentuálna zhoda (NPA) sa počíta ako pomer miest klasifikovaných ako štandardné podľa referenčnej metódy, ktoré analýza správne vykáže.
  - ▶  $(\text{počet štandardných miest správne vykazovaných analýzou}) / (\text{celkový počet štandardných miest})$   
Štandardné miesta vykazované analýzou, ktoré sa zhodujú (sú konkordantné) s referenčnou metódou, sú pravdivo negatívne (TN). Štandardné miesta vykazované analýzou ako varianty sú nepravdivo pozitívne (FP).
- 3 Celková percentuálna zhoda (OPA) sa počíta ako pomer miest, ktoré analýza správne vykazuje vzhľadom na referenčnú metódu.
  - ▶  $((\text{počet variantných miest správne vykazovaných analýzou}) + (\text{počet štandardných miest správne vykazovaných analýzou})) / ((\text{celkový počet variantných miest}) + (\text{celkový počet štandardných miest}))$
- 4 Výpočty PPA, NPA a OPA nezahŕňajú žiadne volania (variantné alebo referenčné miesta nespĺňajú najmenej jeden filter kvality).

- 5 Pomer autozomálnych volaní sa počíta ako celkový počet miest, ktoré „prešli“ filtrom delené celkovým počtom pozícií sekvenovaných pre chromozómy 1 – 22; chromozómy X a Y sú vylúčené. Táto metrika nezohľadňuje zhodu volaní s referenčnou metódou.

## Účinnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov)

### Indexovanie vzorky

Priméry indexu vzorky pridané počas prípravy knižnice priradujú ku každej DNA vzorky jedinečnú sekvenciu. Tieto jedinečné sekvencie umožňujú zoskupiť viacero vzoriek do jedného sekvenčného cyklu. Indexovanie vzoriek sa používa pre pracovné postupy Germline aj Somatic. Účelom tejto štúdie bolo vytvoriť minimálny (8) a maximálny (96) počet vzoriek, ktoré je možné spracovať v rámci jedného cyklu sekvenčného spracovania prístrojom NextSeq 550Dx. Uskutočnilo sa testovanie ôsmich jedinečných platinových genomických vzoriek s 12 odlišnými kombináciami indexovacieho priméru na jednu vzorku. Výsledky zo štyroch cyklov sekvenčného spracovania použitím modulu Germline Variant boli porovnané s platinovými genómami, verzia 2016-1.0.

V rámci prvej skupiny cyklov bolo testovaných 96 jedinečne indexovaných vzorkových knižníc použitím reprezentatívnej analýzy určenej na dotazovanie rôznych génov s pokrytím 12 588 báz na reťazec v rámci všetkých 23 ľudských chromozómov na overenie schopnosti analýzy konzistentne realizovať genotypizačné volanie danej vzorky v rámci rôznych odlišných kombinácií indexovacieho priméru. V prípade druhej množiny cyklov bolo sekvenčne spracovaných osem jedinečne indexovaných vzorkových knižníc vo dvoch cykloch sekvenčného spracovania na overenie minimálneho počtu podporovaných cyklov.

V prípade cyklov s 96 indexmi dosahovala hodnota PPA pre SNV rozpätie od 98,7 % do 100 %, hodnota PPA pre zavedenia a delécie bola 100 % a hodnota NPA bola 100 % pre každú z kombinácií 96 indexov. Cykly s 8 indexmi dosiahli hodnotu PPA 100 % (SNV, zavedenia a delécie) a NPA 100 % pre každú z kombinácií ôsmich indexov.

### Prenos vzorky

Prístroj NextSeq 550Dx umožňuje sekvenčne spracovať viacero vzoriek a kontrol v rámci jedného sekvenčného cyklu. Uskutočnila sa štúdia na hodnotenie rozsahu prenosu vzorky v rámci sekvenčného cyklu (v rámci cyklu) a medzi sekvenčnými cyklami (medzi cyklami). Testované boli dve platinové genomické vzorky (jedna mužská a jedna ženská) použitím reprezentatívnej analýzy určenej na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcej 12 588 báz (150 amplicónov) v rámci 23 rôznych chromozómov (so zahrnutím chromozómov obidvoch pohlaví). Knižnice boli sekvenčne spracované v prístroji NextSeq 550Dx pomocou modulu Germline Variant. Prenos mužských vzoriek do ženských vzoriek bol pozorovaný za prítomnosti načítania amplicónu chromozómu Y v ženských vzorkách.

Prenos v rámci cyklu je možné pozorovať počas generovania klastrov, volania bázy indexového cyklu a demultiplexácie vzorky. Na testovanie prenosu vzoriek počas sekvenčného cyklu bol jeden raz v prístroji NextSeq 550Dx sekvenčne spracovaný súbor knižníc skladajúci sa zo 46 replikátov mužských a ženských vzoriek a štyroch kontrol bez šablóny. Prenos vzorky v rámci cyklu bol hodnotený porovnaním amplicónového pokrytia chromozómu Y každého ženského replikátu s priemerným amplicónovým pokrytím chromozómu Y všetkých mužských replikátov v súbore. Pozorovaná mediánová hodnota prenosu v rámci cyklu bola 0,084 %.

Na testovanie prenosu vzorky medzi cyklami boli pripravené dva súbory knižníc, ktoré boli sekvenčne po sebe spracované v prístroji NextSeq 550Dx. Prvý súbor obsahoval 46 replikátov ženskej vzorky a dve kontroly bez šablóny. Druhý súbor obsahoval 46 replikátov mužskej vzorky a dve kontroly bez šablóny. Obidva súbory využívali rovnakú množinu adaptérov indexu. Ženský súbor bol sekvenčne spracovaný ako prvý, po ňom nasledoval mužský súbor a ďalší opakovaný sekvenčný cyklus ženského súboru. Prenos vzorky medzi cyklami bol hodnotený formou porovnania amplicónového pokrytia chromozómu Y medzi príslušnými replikátmi opakovaného cyklu ženského súboru a cyklu mužského súboru. Pozorovaná mediánová hodnota prenosu medzi cyklami bola 0,0076 %.

### Vstup DNA

#### Krv (Germline)

Pre prístroj NextSeq 550Dx bol stanovený vstupný rozsah DNA z krvi na prípravu knižnice súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx použitím pracovného postupu modulu Germline Variant. Tento rozsah bol hodnotený prostredníctvom štúdie sériového riešenia použitím 13 platinových genomických vzoriek s reprezentatívnou analýzou

slúžiacou na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz v rámci 23 odlišných chromozómov. Knižnica bola sekvenčne spracovaná vo dvoch prístrojoch NextSeq 550Dx použitím jednej šarže súpravy reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Uskutočnil sa test piatich vzoriek v duplikátoch v rámci piatich vstupných úrovní DNA v rozsahu od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 12 ng). Osem vzoriek bolo testovaných v rámci jedného replikátu a každej z ôsmich vstupných úrovní DNA. Na určenie správnosti boli genotypy vzoriek porovnané s platinovými genómami, verzia 2016-1.0. Výsledky boli stanovené pre každú vstupnú úroveň. PPA pre každý typ variantu (SNV, zavedenia a delécie) je uvedený v **Tabuľka 1**; NPA je uvedený v **Tabuľka 2**. Všetky vstupné úrovne vykazovali podobnú presnosť. Odporúčaný vstup DNA pre súpravu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx je 50 ng s hodnotami 25 ng a 100 ng predstavujúcimi dolný a horný limit na splnenie charakteristík účinnosti.

Tabuľka 1 Výsledky PPA pre každý vstup DNA podľa typu variantu

Vstup DNA (ng)	Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Bez volaní variantu	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Zavedenie	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Delécia	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tabuľka 2 NPA pre každý vstup DNA

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Bez volaní referencie	NPA (%)
12	430 940	4	26	>99,9
25	430 936	0	34	100
50	430 936	2	32	>99,9
100	430 942	0	28	100
250	430 942	0	28	100

#### FFPE (modul Somatic)

Pre prístroj NextSeq 550Dx bol stanovený vstupný rozsah DNA zo vzoriek tkaniva fixovaných formalínom a zaliatych do parafínu (FFPE) na prípravu knižnice súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx použitím pracovného postupu modulu Somatic Variant. Vstupný rozsah DNA bol hodnotený prostredníctvom štúdie sériového riedenia použitím troch platinových genomických vzoriek s reprezentatívnou analýzou slúžiacou na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz v rámci 23 odlišných chromozómov. Bunkové línie platinového genómu GM12878 a GM12877 boli po extrakcii DNA fixované vo formalíne a zaliate v parafíne. Genóm GM12878 bol zriadený genómom GM12877 tak, aby sa frekvencie variantnej alely (VAF) 81 variantov (55 SNV, 10 zavedení a 16 delécií) nachádzali v blízkosti hodnôt 0,025, 0,05 alebo 0,10. Okrem toho každá vzorka obsahovala 91 variantov s vyššími variantnými frekvenciami až do 1,0 VAF. Vzorky boli spracované v duplikátoch pri piatich vstupných úrovniach DNA s kvalitatívnym cyklom so strednou hodnotou delta (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 a 7,8 podľa meraní so súpravou TruSeq

Custom Amplicon Dx – FFPE QC. Každá knižnica bola sekvenčne spracovaná vo dvoch prístrojoch NextSeq 550Dx použitím dvoch šarží súpravy reagensii NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Na účely určenia správnosti boli volania vzorkového variantu porovnané s platinovými genómami, verzia 2016-1.0. Hodnoty PPA pre každý typ variantu (SNV, zavedenia a delécie) sú uvedené v **Tabuľka 3** a hodnoty NPA sú uvedené v **Tabuľka 4**. Odporúčaný vstup DNA pre varianty na úrovni 0,05 VAF alebo vyššej je  $dCq \leq 4$ , pričom hodnota 4,6 poskytuje dolný limit na splnenie charakteristík účinnosti.

Tabuľka 3 Výsledky PPA pre každý vstup DNA podľa typu variantu

Stredná hodnota dCq	Typ variantu	Očakávané varianty	Bez očakávaných volaní	VAF cieľového riedenia					
				0,025		0,05		0,10	
				Bez volaní variantu	PPA (%)	Bez volaní variantu	PPA (%)	Bez volaní variantu	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nevzťahuje sa.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Zavedenie	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Delécia	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tabuľka 4 NPA pre každý vstup DNA

Stredná hodnota dCq	Očakávaný štandardný typ	VAF cieľového riedenia					
		0,025		0,05		0,10	
		Bez volaní referencie	NPA (%)	Bez volaní referencie	NPA (%)	Bez volaní referencie	NPA (%)
2,1	93 688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	> 99,9	3296	> 99,9	2996	100
7,8		3020	> 99,9	2880	> 99,9	2448	> 99,9

### Analytická citlivosť (limit blanku [LoB] a detekčný limit [LoD])

Táto štúdia bola realizovaná s cieľom zhodnotiť limit blanku (LoB) a detekčný limit (LoD) pre modul Somatic Variant v prístroji NextSeq 550Dx. Vykonala sa použitím reprezentatívnej analýzy určenej na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz vo 23 rôznych chromozómoch. Bunkové línie platinového genómu GM12878 a GM12877 boli po extrakcii DNA fixované vo formalíne a zaliate v parafíne. Genóm GM12878 bol zriedený genómom GM12877 tak, aby variantné frekvencie 74 variantov (53 SNV, 7 zavedení a 14 delécie) dosahovali hodnotu 0,05 ± 0,02. Genóm GM12877 a zriedený genóm GM12878 (GM12878-D) boli testované v rámci šiestich po sebe nasledujúcich dní jedným prístrojom a použili sa dve šarže súpravy reagensii NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Celkom sa uskutočnilo šesť sekvenčných cyklov. Výsledkom je 60 replikátov pre každý variant v GM12878-D a 72 replikátov pre každú príslušnú štandardnú súradnicu v genóme GM12877 pri každej šarži reagencie. Limity LoB a LoD boli vypočítané použitím klasického prístupu uvádzaného v dokumente CLSI EP17-A2 s využitím neparametrickej možnosti. Limity LoB a LoD boli počítané pre SNV, zavedenia a delécie osobitne zmiešaním variantných frekvencií pre daný typ variantu. Chyba typu I bola definovaná na úrovni 0,01 a chyba typu II bola definovaná na úrovni 0,05.

V prípade limitu LoB boli zmiešané variantné frekvencie zoradené od najnižšej po najvyššiu a bola vypočítaná 99. pozícia pre každú šaržu reagencie a každý typ variantu (Tabuľka 5). Modul Somatic Variant používa na určenie kvalitatívnej detekcie variantov hraničnú hodnotu (efektívny limit LoB) 0,026 VAF. Vypočítaný limit LoB overil, že táto hraničná hodnota vedie k chybe typu I nie vyššej než 0,01.

Tabuľka 5 Limit blanku

Typ variantu	Pozorovania celkom	LoB, šarža reagencie 1 (%)	LoB, šarža reagencie 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Zavedenie	504	0,56	0,56
Delécia	1008	1,20	1,20

V prípade limitu LoD bolo vypočítané percento frekvencie jednotlivých mutácií pre každú šaržu reagencie a každý typ variantu spadajúci pod hraničnú hodnotu 0,026 Tabuľka 6. Keďže percentuálne hodnoty boli nižšie než chyba typu II 5 % (0,05), medián skombinovaných variantných frekvencií bol vypočítaný ako limit LoD (Tabuľka 6). Limit LoD pre každý typ variantu bol použitý ako väčší než dve hodnoty vypočítané pre dve šarže reagencií – 4,97 % pre SNV, 5,12 % pre zavedenia a 5,26 % pre delécie.

Tabuľka 6 Detekčný limit

Šarža reagencie	Typ variantu	Pozorovania celkom	Počet meraní VAF < 2,6 %	Percento meraní VAF < 2,6 %	Detekčný limit (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Zavedenie	420	6	1,4	5,08
	Delécia	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Zavedenie	420	5	1,2	5,12
	Delécia	840	7	0,80	5,26

## Správnosť

### Germline

Uskutočnila sa nasledujúca štúdia s cieľom zhodnotiť správnosť volaní variantov modulu Germline Variant v prístroji NextSeq 550Dx použitím súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Testovaných bolo 13 jedinečných platinových genomických vzoriek použitím reprezentatívnej analýzy slúžiacej na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz (150 amplikónov) v rámci 23 odlišných chromozómov. Vykonalo sa celkom deväť cyklov použitím troch sekvenčných prístrojov, troch šarží reagencií a troch operátorov v priebehu piatich dní. Správnosť bola stanovená pre SNV, zavedenia a delécie formou porovnania výsledkov s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou (platinové genómy, verzia 2016-1.0). Dôveryhodné genomické oblasti boli definované na základe uvedenej referenčnej metódy (ak nie je uvedené inak).

Tabuľka 7 Súhrnné informácie o zhode – modul Germline

Kritériá	Pozorovania celkom <sup>1</sup>	Výsledok podľa pozorovania <sup>2</sup>	Výsledok podľa cyklu <sup>3</sup>
PPA pre SNV	819	98,7	>99,9
PPA pre zavedenia	819	95,0	98,9
PPA pre delécie	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Vypočítané ako počet vzoriek na cyklus (91) × počet cyklov (9) = 819.

<sup>2</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzorky v rámci všetkých 9 cyklov.

<sup>3</sup>Najnižšia hodnota počas agregovanej analýzy údajov z každého cyklu.

Tabuľka 8 obsahuje údaje štúdie prezentované s pozitívnou a negatívnou percentuálnou zhodou podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s platinovými genómami, verzia 2016-1.0, na účely výpočtov PPA. Tri typy variantov (SNV, zavedenia a delécie) sú skombinované. Keďže referenčná metóda poskytuje iba výsledky za varianty s jedným nukleotidom a zavedenia/delécie, výsledky nevariantnej bázy sa porovnávajú so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19 na účely výpočtov NPA.

Tabuľka 8 Zhoda podľa vzoriek – modul Germline

Vzorka	Stredná miera volaní	Očakávané varianty <sup>1</sup>	TP	FN	Bez volaní variantu	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756 762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751 464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757 701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757 638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751 653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754 803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751 905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754 146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754 173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752 469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750 645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756 065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750 015	0	>99,9	100	>99,9

<sup>1</sup> Celkový počet variantov vo všetkých replikátoch vzoriek v rámci 9 cyklov.

Tabuľka 9 obsahuje údaje štúdie prezentované podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou. Detekcia sa hodnotí pre každý typ variantu (SNV, zavedenia a delécie) osobitne. Referenčné polohy sú vylúčené.

Tabuľka 9 Zhoda podľa vzoriek a typu variantu – modul Germline

> vzorka	SNV			Zavedenia			Delécie		
	> očakávané	> TP	> FN	> očakávané	> TP	> FN	Očakávané	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Vzorky boli následne analyzované z hľadiska volania malých zavedení a delécií (indelov). Celkový súhm je uvedený v Tabuľka 10. Celkom existovalo 71 indelov s veľkosťou 1 – 24 bp (zavedenia) a 1 – 25 bp (delécie).

Tabuľka 10 Súhrnné informácie o detekcii indelov modulom Germline

Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Bez volaní variantu	PPA
Zavedenie	18 522	18 018	27	477	99,9
Delécia	17 388	17 073	0	315	100



Táto reprezentatívna analýza zahŕňala 150 amplicónov s cieľom obsiahnuť rôzny genomický obsah. Obsah GC amplicónov spadal do rozsahu 0,19 – 0,87. Amplicóny taktiež obsahovali určité rozsahy opakovaní jedného nukleotidu (napríklad PolyA, PolyT), dinukleotidu a trinukleotidu. Údaje boli skompilované podľa amplicónov (Tabuľka 11) na určenie vplyvu genomického obsahu na percentuálne správne volania. Percentuálne správne volania sa skladajú z variantných a referenčných volaní a dosahujú hodnotu 100 %, ak existujú nesprávne alebo nulové volania.

Tabuľka 11 Modul Germline – správnosť na úrovni amplicóna

Amplicón	Chromozóm	Začiatok amplicóna	Koniec amplicóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplicóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indel	0,22	76 167	0	0	100
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64 701	0	0	100
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indel	0,4	74 529	0	0	100
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indel	0,49	75 348	0	0	100
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	Poly G (5)	0,69	66 339	0	0	100
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57 330	0	0	100
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72 072	0	0	100
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indel	0,28	73 710	0	0	100
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indel	0,38	65 520	0	0	100
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	Nevzťahuje sa	0,65	66 339	0	0	100
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	Poly A (8)	0,35	61 425	0	0	100
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	Poly T (5)	0,42	72 072	0	0	100
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71 253	0	0	100
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	Poly A (5), Poly C (6), indel	0,3	74 529	0	0	100
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Indel	0,43	76 167	0	0	100
16	2	235 016 350	235 016 422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59 787	0	0	100
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indel	0,27	74 823	0	1344	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	Nevzťahuje sa	0,43	67 977	0	0	100
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indel	0,49	57 330	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72 072	0	0	100
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indel	0,57	60 543	0	63	99,9
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	Poly A (6)	0,26	63 882	0	0	100
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79 443	0	0	100
24	4	15 688 604	1 568 8681	78	78	Nevzťahuje sa	0,29	63 882	0	0	100
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50 778	0	0	100
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	Poly A (5)	0,46	56 511	0	0	100
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50 778	0	0	100
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	Nevzťahuje sa	0,78	61 425	0	0	100
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68 796	0	0	100
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	Nevzťahuje sa	0,39	52 416	0	0	100
31	5	74 077 114	74 077 196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67 977	0	0	100
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	Poly T (5)	0,37	54 873	0	0	100
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74 529	0	0	100
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indel	0,43	61 425	0	0	100
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	Poly G (6)	0,68	83 538	0	0	100
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indel	0,63	75 348	0	0	100
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76 608	0	378	99,5
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	80 262	0	0	100
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indel	0,53	77 805	0	0	100
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	Poly C (6)	0,7	70 434	0	0	100
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76 986	0	0	100
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	Poly A (5)	0,44	74 529	0	0	100
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	Nevzťahuje sa	0,44	59 787	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indel	0,35	72 072	0	0	100
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71 253	0	0	100
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indel	0,38	69 615	0	0	100
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73 710	0	0	100
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74 529	0	0	100
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	Nevzťahuje sa	0,31	54 054	0	0	100
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indel	0,35	76 167	0	0	100
51	8	1 817 312	1 817 394	83	83	Nevzťahuje sa	0,42	67 977	0	0	100
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	72 171	0	720	99,0
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indel	0,3	54 873	0	0	100
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	Poly G (6)	0,67	80 262	0	0	100
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indel	0,32	53 235	0	0	100
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	Nevzťahuje sa	0,49	78 624	0	0	100
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	67 977	0	0	100
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79 443	0	0	100
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63 882	0	0	100
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	74 529	0	0	100
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	Poly T (5)	0,3	64 701	0	0	100
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73 710	0	0	100
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indel	0,35	77 805	0	0	100
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indel	0,42	71 747	0	325	99,5
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	Nevzťahuje sa	0,49	65 520	0	0	100
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Nevzťahuje sa	0,51	66 339	0	0	100
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Nevzťahuje sa	0,45	78 624	0	0	100
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indel	0,46	57 330	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	Nevzťahuje sa	0,65	81 900	0	0	100
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	50 778	0	0	100
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	Nevzťahuje sa	0,59	83 538	0	0	100
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	Poly A (5)	0,4	59 787	0	0	100
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	Nevzťahuje sa	0,42	69 615	0	0	100
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	Poly G (6)	0,55	74 529	0	0	100
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indel	0,53	69 615	0	0	100
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69 615	0	0	100
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	69 615	0	0	100
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68 796	0	0	100
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76 167	0	0	100
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	Nevzťahuje sa	0,49	66 339	0	0	100
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	Poly A (6)	0,35	58 149	0	0	100
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	Poly G (5)	0,68	77 805	0	0	100
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	Nevzťahuje sa	0,52	59 787	0	0	100
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72 072	0	0	100
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indel	0,49	72 891	0	0	100
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indel	0,39	63 063	0	0	100
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54 873	0	0	100
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	Nevzťahuje sa	0,25	67 977	0	0	100
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58 642	0	326	99,4
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indel	0,38	66 339	0	0	100
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indel	0,35	74 529	0	0	100
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	Poly A (5)	0,41	54 054	0	0	100
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indel	0,62	76 986	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	Poly C (5)	0,45	78 624	0	0	100
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indel	0,25	55 692	0	0	100
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76 167	0	0	100
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	Poly T (6)	0,43	77 805	0	0	100
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indel	0,65	58 149	0	0	100
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	Nevzťahuje sa	0,36	74 529	0	0	100
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indel	0,56	57 330	0	0	100
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	Nevzťahuje sa	0,27	51 597	0	0	100
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	Poly C (5)	0,67	77 805	0	0	100
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	71 253	0	0	100
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	Poly C (5)	0,67	85 176	0	0	100
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74 529	0	0	100
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	72 891	0	0	100
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71 247	0	6	100
108	17	3 970 090	3 970 180	91	91	Indel	0,46	74 529	0	0	100
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indel	0,26	76 167	0	0	100
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	Poly T (5)	0,54	72 891	0	0	100
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66 343	27	788	98,8
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	Poly A (5)	0,34	74 529	0	0	100
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75 348	0	0	100
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indel	0,41	64 413	0	288	99,6
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	Poly T (7)	0,22	70 434	0	0	100
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	68 796	0	0	100
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	54 873	0	0	100
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	Nevzťahuje sa	0,37	74 529	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56 511	0	0	100
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61 425	0	0	100
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66 339	0	0	100
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indel	0,45	69 615	0	0	100
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	Nevzťahuje sa	0,48	53 235	0	0	100
124	19	625 143	625 241	99	99	Nevzťahuje sa	0,59	81 081	0	0	100
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Nevzťahuje sa	0,68	60 605	1	0	100
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Nevzťahuje sa	0,64	57 330	0	0	100
127	20	746 056	746 149	94	94	Nevzťahuje sa	0,61	76 986	0	0	100
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	67 158	0	0	100
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	62 244	0	0	100
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57 330	0	0	100
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indel	0,63	82 719	0	0	100
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indel	0,36	54 873	0	0	100
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	72 072	0	0	100
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indel	0,57	71 253	0	0	100
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indel	0,35	54 054	0	0	100
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80 262	0	0	100
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indel	0,39	71 253	0	0	100
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56 439	0	72	99,9
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73 710	0	0	100
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indel	0,63	81 900	0	0	100
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	Nevzťahuje sa	0,68	79 443	0	0	100
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indel	0,46	79 443	0	0	100
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	Nevzťahuje sa	0,6	81 081	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indel	0,66	75 348	0	0	100
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	Poly T (5)	0,26	56 511	0	0	100
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	Poly C (5)	0,62	56 511	0	0	100
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	Nevzťahuje sa	0,52	58 149	0	0	100
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Nevzťahuje sa	0,55	0	0	0	Nevzťahuje sa
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Nevzťahuje sa	0,48	0	0	0	Nevzťahuje sa
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nevzťahuje sa

Výsledky sekvenčného spracovania pre vzorku NA12878 boli porovnané s vysoko dôveryhodným genotypom z hľadiska NA12878, vytvoreným Národnými inštitútmi noriem a technológie (NIST) (v.2.19). Spomedzi 150 amplikónov bolo 92 amplikónov úplne obsiahnutých vo vysoko dôveryhodných genomických oblastiach, 41 amplikónov vykazovalo čiastočný presah a 17 amplikónov nemalo žiadny presah v sekvencii NIST. Tento výsledok viedol k porovnaniu 10 000 súradníc/replikát. Nevariantné volania bázy boli porovnané so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19. Výsledky správnosti sú uvedené v [Tabuľka 12](#).

Tabuľka 12 Modul Germline – zhoda vzorky NA12878 s databázou NIST

Vzorka	Počet amplikónov	Stredná miera volaní	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610 470	0	>99,9	100	>99,9

Na základe údajov poskytnutých touto deväťcyklovou štúdiou Germline dokáže prístroj NextSeq 550Dx konzistentne sekvenčne spracovať:

- ▶ Obsah GC  $\geq$  19 % (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch so správne volaným 19 % obsahom GC a mierou nulových volaní 0,6 %)
- ▶ Obsah GC  $\leq$  87 % (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch so správne volaným 87 % obsahom GC s nulovým podielom nulových volaní)
- ▶ Dĺžky PolyA  $\leq$  9 (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyA deviatich nukleotidov so správnymi volaniami a nulovým podielom nulových volaní)
- ▶ Dĺžky PolyT  $\leq$  10 (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyT desiatich nukleotidov so správnymi volaniami a nulovým podielom nulových volaní)
- ▶ Dĺžky PolyG  $\leq$  7 (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyG siedmich nukleotidov so správnymi volaniami a mierou nulových volaní 1,0 %)
- ▶ Dĺžky PolyC  $\leq$  6 (všetky volané bázy v 2457 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyC šiestich nukleotidov so správnymi volaniami a nulovým podielom nulových volaní)
- ▶ Dĺžky dinukleotidových opakovaní  $\leq$  11x (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 11x dinukleotidové opakovanie boli volané správne s mierou nulových volaní 0,5 %)
- ▶ Dĺžky trinukleotidových opakovaní  $\leq$  5x (všetky volané bázy v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 5x trinukleotidové opakovanie boli volané správne s mierou nulových volaní 0,5 %)
- ▶ Dĺžky zavedenia  $\leq$  24 (66 343 spomedzi 66 370 volaných báz v 819 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 24-nukleotidové zavedenie bolo volaných správne s mierou nulových volaní 1,2 %; v oblasti obsahujúcej 24-nukleotidové zavedenie sa nevyskytli žiadne nesprávne volania)
- ▶ Dĺžky delécie  $\leq$  25 (všetky volané bázy v 2457 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 25-nukleotidovú deléciu boli volané správne s nulovým podielom nulových volaní)

### Somatic

Cieľom tu uvádzanej štúdie bolo zhodnotiť správnosť volania variantu modulom Somatic Variant v prístroji NextSeq 550Dx použitím súpravy reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

V tejto štúdiu bola použitá reprezentatívna analýza určená na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz vo 23 rôznych chromozómoch. Platinová genomická DNA bola extrahovaná z ošetrovaných blokov FFPE na účely generovania šiestich jedinečných vzoriek na hodnotenie v rámci štúdie.

DNA vzorky GM12877 bola zriadená s DNA vzorky GM12878 na vytvorenie produktov GM12877-D5 a GM12877-D7 ako súboru jedinečných heterozygotných variantov s variantnými frekvenciami blížiacimi sa k hodnotám 5 % a 7 %. DNA vzorky GM12878 bola podobne zriadená DNA vzorky GM12877 na vytvorenie produktov GM12878-D5 a GM12878-D7. Každá zo vzoriek bola testovaná trikrát (okrem zriadených vzoriek, ktoré boli testované v šiestich replikátoch). Vykonal sa celkom deväť cyklov použitím troch sekvenčných prístrojov, troch šarží reagentov a troch operátorov v priebehu piatich dní. Správnosť bola stanovená pre SNV, zavedenia a delécie formou porovnania výsledkov s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou (platinové genómy, verzia 2016-1.0). Ak nie je uvedené inak, dôveryhodné genomické oblasti boli definované na základe tejto referenčnej metódy.



Tabuľka 13 Súhrnné informácie o zhode – modul Somatic

Kritériá	Pozorovania celkom <sup>1</sup>	Výsledok podľa pozorovania <sup>2</sup>	Výsledok podľa cyklu <sup>3</sup>
PPA pre SNV	378	98,9	99,9
PPA pre zavedenia	378	96,9	99,9
PPA pre delécie	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Vypočítané ako počet vzoriek na cyklus (42) × počet cyklov (9) = 378.

<sup>2</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzorky v rámci všetkých 9 cyklov.

<sup>3</sup>Najnižšia hodnota počas agregovanej analýzy údajov z každého cyklu.

Tabuľka 14 obsahuje údaje štúdie prezentované s pozitívnou a negatívnou percentuálnou zhodou podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou na účely výpočtov PPA. Tri typy variantov (SNV, zavedenia a delécie) sú skombinované. Keďže referenčná metóda poskytuje iba výsledky za varianty s jedným nukleotidom a zavedenia/delécie, výsledky nevariantnej bázy sa porovnávajú so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19 na účely výpočtov NPA.

Tabuľka 14 Zhoda podľa vzoriek – modul Somatic

Vzorka	Stredná miera volaní	Očakávané	TP	FN	Bez volaní variantu	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318 682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317 645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323 614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322 038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322 121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323 048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630 621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629 719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628 582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629 803	0	100	100	100

Tabuľka 15 obsahuje údaje štúdie prezentované podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou. Detekcia sa hodnotí pre každý typ variantu (SNV, zavedenia a delécie) osobitne. Referenčné polohy sú vylúčené.

Tabuľka 15 Zhoda podľa vzoriek a typu variantu – modul Somatic

Vzorka	SNV			Zavedenia			Delécie		
	Očakávané	TP	FN	Očakávané	TP	FN	Očakávané	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0

Vzorka	SNV			Zavedenia			Delécie		
	Očakávané	TP	FN	Očakávané	TP	FN	Očakávané	TP	FN
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Desať vzoriek bolo následne analyzovaných z hľadiska volania malých zavedení a delécií (indelov) (Tabuľka 16). Celkom existovalo 71 indelov s veľkosťou 1 – 24 bp (zavedenia) a 1 – 25 bp (delécie).

Tabuľka 16 Súhrnné informácie o detekcii indelov modulom Somatic

Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Bez volaní variantu	PPA
Zavedenie	10 773	10 282	9	482	99,2
Delécia	11 502	10 667	5	830	> 99,9

150 amplicónov bolo určených na pokrytie rôzneho genomického obsahu. Obsah GC amplicónov spadal do rozsahu 0,19 – 0,87 %. Amplicóny taktiež obsahovali určité rozsahy opakovaní jedného nukleotidu (napríklad PolyA, PolyT), dinukleotidu a trinukleotidu. Údaje boli skompilované podľa amplicónov (Tabuľka 17) na určenie vplyvu genomického obsahu na percentuálne správne volania. Percentuálne správne volania sa skladajú z variantných a referenčných volaní a dosahujú hodnotu 100 %, ak existujú nesprávne alebo nulové volania.

Tabuľka 17 Modul Somatic – správnosť na úrovni amplicóna

Amplicón	Chromozóm	Začiatok amplicóna	Koniec amplicóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplicóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indel	0,22	35 066	0	88	99,7
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29 827	0	35	99,9
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indel	0,4	34 202	0	283	99,2
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indel	0,49	34 613	0	163	99,5
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	Poly G (5)	0,69	30 571	0	47	99,8
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26 452	0	8	100,0
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	33 148	0	116	99,7
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indel	0,28	33 928	0	92	99,7
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indel	0,38	30 218	0	22	99,9
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	Nevzťahuje sa	0,65	30 616	0	2	>99,9
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	Poly A (8)	0,35	28 017	0	499	98,3
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	Poly T (5)	0,42	33 207	0	57	99,8
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32 524	9	718	97,8
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	Poly A (5), Poly C (6), indel	0,3	33 972	0	456	98,7
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Nevzťahuje sa	0,43	35 051	0	103	99,7

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
16	2	235 016 350	235 016 422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27 459	0	136	99,5
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indel	0,27	34 534	0	620	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	Nevzťahuje sa	0,43	31 339	0	44	99,9
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indel	0,49	26 373	0	87	99,7
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32 829	0	857	97,5
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indel	0,57	27 925	0	47	99,8
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	Poly A (6)	0,26	29 327	4	162	99,4
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36 585	0	117	99,7
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	Nevzťahuje sa	0,29	29 427	0	57	99,8
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23 356	5	75	99,7
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	Poly A (5)	0,46	25 942	0	140	99,5
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22 944	0	560	97,6
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	Nevzťahuje sa	0,78	28 299	0	53	99,8
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	31 658	0	94	99,7
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	Nevzťahuje sa	0,39	24 120	0	72	99,7
31	5	74 077 114	74 077 196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31 297	0	77	99,8
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	Poly T (5)	0,37	25 277	0	55	99,8

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34 308	0	90	99,7
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indel	0,43	28 266	0	163	99,4
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	Poly G (6)	0,68	38 489	0	67	99,8
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indel	0,63	34 730	0	46	99,9
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35 057	0	483	98,6
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	36 647	0	406	98,9
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indel	0,53	35 681	0	238	99,3
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	Poly C (6)	0,7	32 438	0	70	99,8
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35 441	0	91	99,7
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	Poly A (5)	0,44	34 354	0	44	99,9
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	Nevzťahuje sa	0,44	27 575	0	28	99,9
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indel	0,35	33 060	0	213	99,4
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32 423	0	489	98,5
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indel	0,38	32 074	0	56	99,8
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33 791	0	281	99,2
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34 316	0	82	99,8
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	Nevzťahuje sa	0,31	24 901	0	47	99,8
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indel	0,35	35 067	0	87	99,8
51	8	1 817 312	1 817 394	83	83	Nevzťahuje sa	0,42	31 365	0	9	>99,9

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	32 781	0	890	97,4
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indel	0,3	25 228	0	146	99,4
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	Poly G (6)	0,67	36 968	0	76	99,8
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indel	0,32	24 472	0	100	99,6
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	Nevzťahuje sa	0,49	36 203	0	85	99,8
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	31 329	0	45	99,9
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36 472	0	201	99,5
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29 473	0	11	>99,9
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	34 188	0	213	99,4
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	Poly T (5)	0,3	29 843	0	19	99,9
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33 968	0	68	99,8
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indel	0,35	35 829	0	81	99,8
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indel	0,42	32 098	88	2048	93,8
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	Nevzťahuje sa	0,49	30 217	0	28	99,9
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Nevzťahuje sa	0,51	30 531	0	96	99,7
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Nevzťahuje sa	0,45	36 105	0	192	99,5
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indel	0,46	26 318	0	153	99,4
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	Nevzťahuje sa	0,65	37 785	0	24	99,9
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	23 368	0	68	99,7
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	Nevzťahuje sa	0,59	38 546	0	10	>99,9

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	Poly A (5)	0,4	27 516	0	78	99,7
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	Nevzťahuje sa	0,42	32 083	0	48	99,9
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	Poly G (6)	0,55	34 047	0	369	98,9
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indel	0,53	32 065	0	74	99,8
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32 083	0	47	99,9
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	32 103	0	27	99,9
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31 645	16	525	98,3
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34 824	0	330	99,1
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	Nevzťahuje sa	0,49	30 497	0	121	99,6
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	Poly A (6)	0,35	26 773	0	65	99,8
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	Poly G (5)	0,68	35 830	9	72	99,8
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	Nevzťahuje sa	0,52	27 498	0	114	99,6
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32 824	0	566	98,3
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indel	0,49	33 574	0	77	99,8
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indel	0,39	29 075	0	31	99,9
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25 313	0	13	99,9
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	Nevzťahuje sa	0,25	31 360	0	22	99,9
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26 499	0	717	97,4
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indel	0,38	30 494	0	133	99,6

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indel	0,35	34 313	0	86	99,7
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	Poly A (5)	0,41	24 555	0	1527	94,1
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indel	0,62	35 472	0	69	99,8
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	Poly C (5)	0,45	36 264	0	24	99,9
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indel	0,25	25 667	0	37	99,9
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34 745	0	432	98,8
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	Poly T (6)	0,43	35 870	0	40	99,9
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indel	0,65	26 762	0	76	99,7
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	Nevzťahuje sa	0,36	34 286	0	112	99,7
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indel	0,56	26 449	0	11	>99,9
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	Nevzťahuje sa	0,27	23 809	0	5	>99,9
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	Poly C (5)	0,67	35 860	0	50	99,9
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	32 835	0	60	99,8
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	Poly C (5)	0,67	39 177	0	144	99,6
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34 075	0	323	99,1
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	33 632	0	11	>99,9
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32 752	0	134	99,6
108	17	3 970 090	3 970 180	91	91	Indel	0,46	34 343	0	82	99,8
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indel	0,26	35 077	0	78	99,8
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	Poly T (5)	0,54	33 553	0	89	99,7
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30 554	53	2296	92,9
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	Poly A (5)	0,34	34 360	0	38	99,9



Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34 367	0	418	98,8
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indel	0,41	29 751	0	119	99,6
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	Poly T (7)	0,22	32 176	0	340	99,0
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	31 604	7	141	99,5
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	25 273	8	45	99,8
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	Nevzťahuje sa	0,37	34 386	0	12	> 99,9
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25 692	0	399	98,5
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27 923	0	893	96,9
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30 598	0	20	99,9
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indel	0,45	31 969	0	161	99,5
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	Nevzťahuje sa	0,48	24 531	0	48	99,8
124	19	625 143	625 241	99	99	Nevzťahuje sa	0,59	37 298	0	124	99,7
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Nevzťahuje sa	0,68	27 881	0	109	99,6
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Nevzťahuje sa	0,64	26 442	0	26	99,9
127	20	746 056	746 149	94	94	Nevzťahuje sa	0,61	35 501	0	31	99,9
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	30 951	0	72	99,8
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	28 686	0	42	99,9
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26 372	0	88	99,7
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indel	0,63	38 159	0	20	99,9

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikóna	Koniec amplikóna	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v dôveryhodných oblastiach	Genomický obsah amplikóna	Obsah GC	Správne volania	Nesprávne volania	Nulové (žiadne) volania	% správnych volaní
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indel	0,36	25 188	0	544	97,9
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	32 969	0	309	99,1
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indel	0,57	32 818	0	77	99,8
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indel	0,35	24 758	9	181	99,2
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36 902	0	160	99,6
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indel	0,39	32 841	0	48	99,9
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25 939	0	280	98,9
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33 942	0	78	99,8
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indel	0,63	37 733	0	86	99,8
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	Nevzťahuje sa	0,68	36 617	0	49	99,9
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indel	0,46	36 525	0	162	99,6
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	Nevzťahuje sa	0,6	37 398	0	24	99,9
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indel	0,66	34 754	0	22	99,9
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	Poly T (5)	0,26	26 046	0	36	99,9
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	Poly C (5)	0,62	26 019	0	63	99,8
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	Nevzťahuje sa	0,52	26 780	0	58	99,8
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Nevzťahuje sa	0,55	0	0	0	Nevzťahuje sa
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Nevzťahuje sa	0,48	0	0	0	Nevzťahuje sa
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nevzťahuje sa

Výsledky sekvenčného spracovania pre vzorku GM12878 boli porovnané s vysoko dôveryhodným genotypom z hľadiska NA12878, vytvoreným Národnými inštitútmi noriem a technológie (NIST) (v.2.19). Spomedzi 150 amplikónov bolo 92 amplikónov úplne obsiahnutých vo vysoko dôveryhodných genomických oblastiach, 41 amplikónov vykazovalo čiastočný presah a 17 amplikónov nemalo žiadny presah v sekvencii NIST. Tento výsledok viedol k porovnaniu 10 000 súradníc/replikát. Nevariantné volania bázy boli porovnané so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19. Výsledky správnosti sú uvedené v [Tabuľka 18](#).

Tabuľka 18 Modul Somatic – zhoda vzorky GM12878 s databázou NIST

Vzorka	Počet amplikónov	Stredná miera volaní	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258 488	0	100	100	100

Na základe údajov poskytnutých touto deväťcyklovou štúdiou Somatic dokáže prístroj NextSeq 550Dx konzistentne sekvenčne spracovať:

- ▶ Obsah GC  $\geq$  19 % (všetky volané bázy v 378 sekvenčne spracovaných amplikónoch so správne volaným 19 % obsahom GC a mierou nulových volaní 2,6 %)
- ▶ Obsah GC  $\leq$  87 % (všetky volané bázy v 378 sekvenčne spracovaných amplikónoch so správne volaným 87 % obsahom GC a mierou nulových volaní 0,6 %)
- ▶ Dĺžky PolyA  $\leq$  9 (všetky volané bázy v 378 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyA deviatich nukleotidov so správnym volaním a podielom nulových volaní 2,5 %)
- ▶ Dĺžky PolyT  $\leq$  10 (všetky volané bázy v 378 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyT desiatich nukleotidov so správnym volaním a podielom nulových volaní nižším než 0,1 %)
- ▶ Dĺžky PolyG  $\leq$  6 (všetky volané bázy v 2268 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyG šiestich nukleotidov so správnym volaním a mierou nulových volaní 0,5 %)
- ▶ Dĺžky PolyC  $\leq$  6 (všetky volané bázy v 756 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie PolyC šiestich nukleotidov so správnym volaním a mierou nulových volaní 0,4 %)
- ▶ Dĺžky dinukleotidových opakovaní  $\leq$  4x (všetky volané bázy v 1890 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 4x dinukleotidové opakovanie boli volané správne s mierou nulových volaní 0,9 %)
- ▶ Dĺžky trinukleotidových opakovaní  $\leq$  5x (všetky volané bázy v 378 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 5x trinukleotidové opakovanie boli volané správne s mierou nulových volaní 1,4 %)
- ▶ Dĺžky zavedenia  $\leq$  23 (všetky volané bázy v 378 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 23-nukleotidové zavedenie so správnym volaním a mierou nulových volaní 0,8 %)
- ▶ Dĺžky delécie  $\leq$  25 (všetky volané bázy v 1134 sekvenčne spracovaných amplikónoch obsahujúcich 25-nukleotidovú deléciu boli volané správne s podielom nulových volaní 0,7 %)

## Presnosť

Presnosť prístroja NextSeq 550Dx bola stanovená testovaním 13 jedinečných platínových genomických vzoriek v troch prístrojoch použitím troch šarží reagensií a troma operátormi, výsledkom čoho bolo deväť sekvenčných cyklov v priebehu piatich dní. Reprezentatívna analýza, vzorky a referenčná metóda sú rovnaké ako tie, ktoré boli uvedené v prípade štúdie správnosti Germline. Podiely k presnosti boli určené analýzou komponentných odchýlok použitím VAF ako reakčnej premennej a výpočtom štandardných odchýlok na úrovni komponentu pre prístroj, šaržu reagensie, operátora a deň (začiatkový) ([Tabuľka 19](#)). Celkový počet pozorovaní použitých v analýze pre každú variabilitu komponentu prístroja, operátora alebo šarže reagensie bol 699 (SNV), 176 (zavedenia) a 235 (delécie).

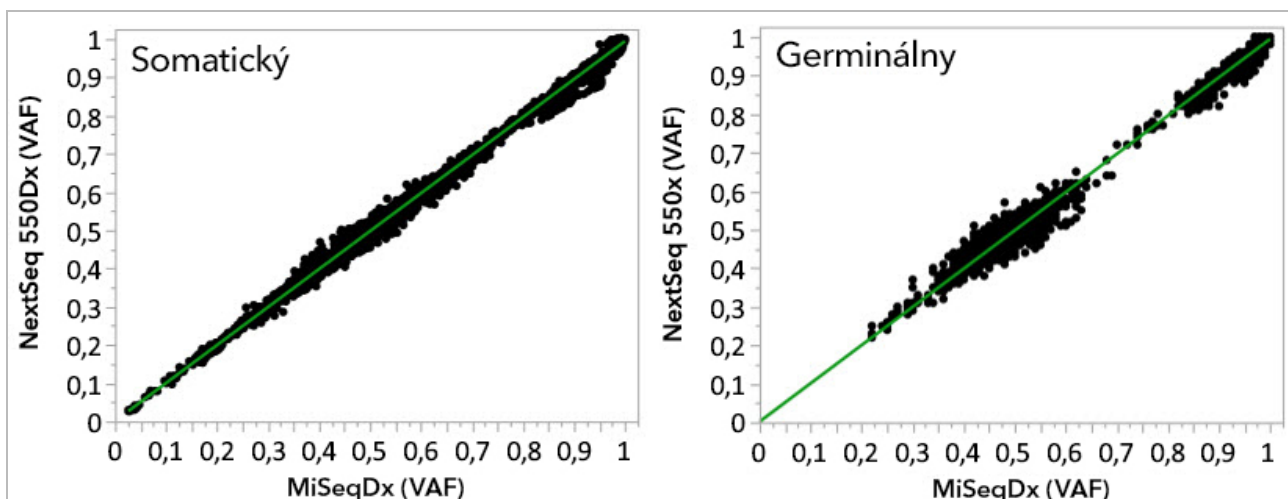
Tabuľka 19 Výsledky testovania presnosti prístroja NextSeq 550Dx (štandardná odchýlka)

Komponent	Typ variantu	Štandardná odchýlka komponentu		Celková štandardná odchýlka	
		Max.	Medián	Max.	Medián
Šarža	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Zavedenie	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delécia	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Prístroj	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Zavedenie	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delécia	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operátor	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Zavedenie	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delécia	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Deň	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Zavedenie	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delécia	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

### Porovnanie metód (platforma sekvenčného spracovania)

Vzorky celej krvi a FFPE boli hodnotené v prístrojoch NextSeq 550Dx a MiSeqDx použitím pracovných tokov Germline a Somatic a súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Zhoda variantnej frekvencie krvných vzoriek a vzoriek FFPE bola hodnotená použitím viacerých reprezentatívnych analýz. Obrázok 2 uvádza koreláciu VAF medzi dvoma prístrojmi pre jednu reprezentatívnu analýzu a Tabuľka 20 uvádza súhm tejto korelácie podľa analytických panelov. Na základe významnej korelácie medzi prístrojmi MiSeqDx a NextSeq 550Dx bolo určené, že charakteristiky účinnosti súvisiace s predanalytickými faktormi (napríklad metódy extrakcie alebo rušivé látky) sa vzťahujú na obidva prístroje. Ďalšie informácie nájdete v príbalovom letáku k súprave TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Obrázok 2 Korelácia VAF medzi prístrojmi MiSeqDx a NextSeq 550Dx pre vzorky FFPE (vľavo) a krvné vzorky (vpravo) pri použití analýzy 1



Tabuľka 20 Výsledky porovnania metód pri použití jedinečných vzoriek krvi a FFPE

Zdroj gDNA	Analýza (oligonukleotický panel)	Biologické replikáty (vzorky)	Technické replikáty (na vzorku)	Pozorovania (počet variantov)	Strmosť	Zachytenie	Korelácia (R <sup>2</sup> )
Krv	Analýza 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Krv	Analýza 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analýza 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Analýza 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>Na základe uvádzaného obmedzenia modulu Germline Variant boli odstránené dva údajové body.

<sup>2</sup>Koeficient určenia pre VAF sa vykresľuje podľa ilustrácie na obrázku 2.

## Reprodukovateľnosť

Reprodukovateľnosť prístroja NextSeq 550Dx bola hodnotená použitím platinových genomických vzoriek s reprezentatívnou analýzou určenou na dotazovanie rôznych génov pokrývajúcich 12 588 báz v rámci 23 rôznych chromozómov pomocou 150 amplikónov. Testovanie Germline zahŕňalo sedem replikátov 13 vzoriek; testovanie Somatic zahŕňalo šesť replikátov siedmich vzoriek na rôznych úrovniach VAF. Vzorky boli pripravené použitím súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testovanie sa uskutočnilo na troch externých pracoviskách použitím jednej šarže súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Na každom pracovisku bol použitý jeden prístroj NextSeq 550Dx. Na každom pracovisku vykonávali testovanie dvaja operátori. Každý operátor vykonával testovanie každého typu vzorky v priebehu troch po sebe nenasledujúcich dní, t. j. celkom sa na troch pracoviskách uskutočnilo 36 cyklov testovania. Toto testovanie zahŕňalo 18 cyklov pre pracovné postupy Germline a 18 cyklov pre pracovné postupy Somatic.

## Germline

Variety Germline s hladinou VAF  $\geq 0,2$  sa vykazujú ako pozitívne (varianty). V prípade očakávaných pozitívnych variantov Germline boli údaje hodnotené z hľadiska miery výskytu nulových volaní a miery správnych pozitívnych volaní v rámci každého typu variantu (SNV, zavedenie, delécia). Tabuľka 21 obsahuje súhrnné informácie o pozorovaných mierach výskytu spolu s minimálnymi a maximálnymi úrovňami spoľahlivosti 95 % (LCL/UCL) vypočítanými podľa metódy Wilsonovho skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 21 Pozorovania volaní Germline – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu

Typ variantu	Nulové (žiadne) volanie			Správne pozitívne volanie				
	Pozorované	Celkom	Percento	Pozorované	Celkom	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Zavedenia	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delécie	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Variety Germline s hladinou VAF  $< 0,2$  sa vykazujú ako negatívne (štandardné). V prípade očakávaných pozícií negatívnych variantov Germline boli údaje hodnotené z hľadiska miery výskytu nulových volaní a miery výskytu štandardných volaní. Tabuľka 22 obsahuje súhrnné informácie o pozorovaných mierach výskytu spolu s minimálnymi a maximálnymi úrovňami spoľahlivosti 95 % (LCL/UCL) vypočítanými podľa metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 22 Pozorovania volaní Germline – očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Nulové (žiadne) volanie			Správne negatívne volanie				
	Pozorované	Celkom	Percento	Pozorované	Celkom	Percento	95 % LCL	95 % UCL
Štandardný typ	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Variety Germline s hladinou VAF  $\geq 0,2$  a  $< 0,7$  sú pre daný variant nazývané ako pozitívne heterozygotné a variety s hladinou VAF  $\geq 0,7$  sú pre daný variant označované ako pozitívne homozygotné. Vzorky Germline s heterozygotnými variantmi sa použili na určenie skutočnosti, či vnútorná variabilita analýzy ovplyvní volanie genotypu. Hodnota Cx bola stanovená pre obidve hraničné hodnoty (0,2 v prípade heterozygotných a 0,7 v prípade homozygotných genotypov), kde x predstavuje pomer opakovaných testov, ktorých hodnota presiahla hraničnú hodnotu. V prípade dolnej hraničnej hodnoty 0,2 VAF bola hodnota Cx  $\geq 99,999$  %, čo znamená, že  $\geq 99,999$  % heterozygotných variantov by bolo označených ako heterozygotné. Vzhľadom na hornú hraničnú hodnotu 0,7 VAF bola hodnota Cx  $\leq 0,001$  %, čo znamená, že  $\leq 0,001$  % heterozygotných variantov by bolo označených ako homozygotné. **Tabuľka 23** obsahuje súhrn výsledkov podľa typu variantu.

Variety Germline s hladinou VAF  $\geq 0,2$  a  $< 0,7$  sú pre daný variant nazývané ako pozitívne heterozygotné a variety s hladinou VAF  $\geq 0,7$  sú pre daný variant označované ako pozitívne homozygotné. Vzorky Germline s heterozygotnými variantmi sa použili na určenie skutočnosti, či vnútorná variabilita analýzy ovplyvní volanie genotypu. Hodnota Cx bola stanovená pre obidve hraničné hodnoty (0,2 v prípade heterozygotných a 0,7 v prípade homozygotných genotypov), kde x predstavuje pomer opakovaných testov, ktorých hodnota presiahla hraničnú hodnotu. Vzhľadom na dolnú hraničnú hodnotu 0,2 VAF bola hodnota Cx  $\geq 99,999$  %, čo znamená, že  $\geq 99,999$  % heterozygotných variantov by bolo označených ako heterozygotné. Vzhľadom na hornú hraničnú hodnotu 0,7 VAF bola hodnota Cx  $\leq 0,001$  %, čo znamená, že  $\leq 0,001$  % heterozygotných variantov by bolo označených ako homozygotné. **Tabuľka 23** obsahuje súhrn výsledkov podľa typu variantu.

Tabuľka 23 Hodnoty Germline Cx pre heterozygotné variety

Typ variantu	Hraničná hodnota na úrovni 0,2 VAF	Hraničná hodnota na úrovni 0,7 VAF
	$\geq C99,999$ %	$\leq C0,001$ %
SNV	94/94	94/94
Zavedenia	24/24	24/24
Delécie	35/35	35/35
Celkom	153	153

### Somatic

Variety Somatic s hladinami VAF  $\geq 0,026$  sa vykazujú ako pozitívne (variety). Pozorovania s hladinami VAF  $\geq 0,01$  a  $< 0,026$  boli považované za ekvivočné na účely tejto analýzy (ani pozitívne ani negatívne s označením nižšej variantnej frekvencie). Na účely hodnotenia účinnosti boli výsledky počítané troma spôsobmi:

- ▶ Najlepší prípad: každý ekvivočný výsledok bol považovaný za správne pozitívne volanie (zhoda s očakávanými výsledkami)
- ▶ Najhorší prípad: každý ekvivočný výsledok bol považovaný za nesprávne volanie (nezhoda s očakávanými výsledkami)
- ▶ Prípady vylúčenia: každý ekvivočný výsledok bol z analýzy vylúčený

**Tabuľka 24**, **Tabuľka 25** a **Tabuľka 26** obsahujú súhrnné informácie o výsledkoch volaní pre režim najlepšieho prípadu, najhoršieho prípadu a prípadu vylúčenia spolu s minimálnymi a maximálnymi hladinami spoľahlivosti 95 % (LCL/UCL) vypočítanými pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 24 Pozorovania volaní Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu

Typ variantu	Správne pozitívne volanie				
	Pozorované	Celkom	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Zavedenia	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Delécie	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabuľka 25 Pozorovania volaní Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (najhorší prípad)

Typ variantu	Správne pozitívne volanie				
	Pozorované	Celkom	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Zavedenia	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Delécie	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabuľka 26 Pozorovania volaní Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (odstránené ekvivokálne volania)

Typ variantu	Správne pozitívne volanie				
	Pozorované	Celkom	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Zavedenia	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Delécie	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Varianty Somatic s hladinou VAF < 0,01 sa vykazujú ako negatívne (štandardné) volania. V prípade očakávaných pozícií negatívnych variantov Somatic boli údaje hodnotené z hľadiska miery výskytu nulových volaní a miery výskytu správnych štandardných volaní. Správne štandardné volania boli určené vylúčením nulových volaní a odpočítaním pozorovaných volaní, ktoré spadali do ekvivokálnej zóny (hladiny VAF  $\geq 0,01$  a < 0,026), ako aj nesprávnych volaní, ktoré presahovali hraničnú hodnotu (hladiny VAF  $\geq 0,026$ ), z celkového počtu volaní. **Tabuľka 27** obsahuje súhrnné informácie o pozorovaných, celkových a percentuálnych výsledkoch pre umiestnenia negatívnych variantov Somatic vzhľadom na mieru výskytu nulových volaní a správnych štandardných volaní spolu s minimálnymi a maximálnymi hladinami spoľahlivosti 95 % (LCL/UCL) vypočítanými podľa metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 27 Pozorovania volaní Somatic – očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Nulové (žiadne) volanie			Správne volanie						
	Pozorované	Celkom	Percento	Ekvivokálne	Nesprávne	Správne	Celkom	Percento	95 % LCL	95 % UCL
Štandardný typ	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Vzorky Somatic na rozdielnych úrovniach VAF rovnakého variantu boli hodnotené s cieľom určiť C95 analýzy (v rámci každého typu variantu). Na hodnotenie variability v blízkosti hraničných hodnôt analýzy sa použili vzorky s očakávanou hodnotou VAF od 0,02 do 0,07. Hodnota C95 bola stanovená pre každý variant a najvyššiu hodnotu C95 pre každý typ variantu uvádza **Tabuľka 28**.

Tabuľka 28 Súhrn hodnôt C95 modulu Somatic

Typ variantu	N	C95
SNV	74	0,0613
Zavedenie	24	0,0573
Delécia	33	0,0575

## Účinnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov)

### Základné informácie

V prístroji NextSeq 550Dx sa používajú dve súpravy reagensí: súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Na demonštráciu skutočnosti, že súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) dokáže splniť požiadavky na účinnosť overené a validované použitím súpravy NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov), boli realizované štúdie použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Vykonal sa dve prípravy knižníc pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx – jedna použitím pracovného postupu Germline a druhá použitím pracovného postupu Somatic. Knižnice z každého pracovného postupu boli testované použitím troch šarží súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) v troch prístrojoch NextSeq 550Dx. Okrem toho testovanie v rámci každého pracovného postupu zahŕňalo jeden cyklus so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

### Analytická citlivosť (limit blanku [LoB] a detekčný limit [LoD])

Overenie použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) preukázalo, že prístroj NextSeq 550Dx dokáže detegovať varianty s hodnotou 0,05 VAF s chybou typu II  $\leq 0,05$  a že hraničná hodnota 0,026 VAF používaná modulom Somatic Variant (efektívny limit LoB) podporuje chybu typu I  $\leq 0,01$ . Na základe uvedených skutočností sa predpokladá, že variant s hodnotou 0,05 VAF je 95 % času väčší alebo rovnaký ako 0,026 VAF a že 99 % času je poloha štandardného typu menšia než 0,026 VAF. Na účely overenia, či tieto predpoklady boli použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) splnené, sa uskutočnili opakované merania v prístroji NextSeq 550Dx použitím štandardných vzoriek (vzorky LoB) a vzoriek obsahujúcich varianty s hodnotou 0,05 VAF (vzorky LoD), ako aj súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Pomer volaní nad a pod hraničnou hodnotou 0,026 bol následne porovnaný s predpokladmi stanovenými pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Testovanie zahŕňalo dve vzorky LoD s jedinečným súborom variantov cielených na hodnotu 0,05 VAF a príslušné vzorky LoB, ktoré boli pre cieľové varianty štandardného typu. Na účely prípravy knižníc boli v replikátoch (osem a sedem) spracované vzorky LoD a LoB použitím súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Knižnice boli na úvod sekvenčne spracované pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) na účely identifikácie variantov/genomických súradníc na hodnotenie limitov LoB/LoD použitím súpravy NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Všetky varianty s priemernou hodnotou VAF od 0,045 do 0,055 (varianty LoD) na základe výsledkov z použitia súpravy NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) boli použité na analýzu limitu LoD ( $n = 51$  variantov). Na účely analýzy limitu LoB bolo zhodnotených 51 príslušných genomických súradníc.

Na účely hodnotenia súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) boli knižnice sekvenčne spracované v rámci troch cyklov v priebehu troch po sebe nasledujúcich dní použitím rovnakého prístroja a šarže súpravy reagensí. Toto testovanie zahŕňalo 24 replikátov každého z 51 variantov LoD a 21 replikátov každej z príslušných štandardných pozícií. Pomer štandardných volaní s hodnotou VAF  $< 0,026$  je uvedený v [Tabuľka 29](#). Pomer volaní variantu LoD s hodnotou VAF väčšou alebo rovnajúcou sa 0,026 je uvedený v [Tabuľka 30](#).



Tabuľka 29 Pomer volaní &lt; 0,026 pre štandardné pozície (hodnotenie predpokladu LoB)

Typ variantu	Hodnotené pozície	Pozorovania celkom	Počet meraní VAF ≥ 2,6 %	Pomer < 2,6 %	Pomer 95 % Interval spoľahlivosti
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Zavedenie	11	231	0	1	0,984 – 1
Delécia	8	168	0	1	0,978 – 1

Tabuľka 30 Pomer volaní ≥ 0,026 VAF pre varianty LoD (hodnotenie predpokladu LoD)

Typ variantu	Hodnotené pozície	Pozorovania celkom	Počet meraní VAF < 2,6 %	Počet meraní VAF ≥ 2,6 %	Pomer ≥ 2,6 %	Pomer 95 % Interval spoľahlivosti
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Zavedenie	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Delécia	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

## Správnosť

### Germline

Uskutočnila sa nasledujúca štúdia s cieľom zhodnotiť správnosť volaní variantov s modulom Germline Variant a použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Na testovanie dvanástich jedinečných platinových genomických vzoriek sa použila reprezentatívna analýza. Uskutočnilo sa spracovanie celkom 11 cyklov použitím troch prístrojov NextSeq 550Dx a troch súprav reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

Správnosť bola stanovená pre SNV, zavedenia a delécie formou porovnania výsledkov s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou platinových genómov, verzia 2016-1.0. Výsledky správnosti z jedného cyklu referenčného spracovania so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) sú uvedené na referenčné účely. Súhm výsledkov je uvedený v [Tabuľka 31](#).

Tabuľka 31 Súhrnné informácie o zhode – modul Germline

Kritériá	Pozorovania celkom (v2.5) <sup>1</sup>	Výsledok podľa pozorovania (v2.5) <sup>2</sup>	Výsledok podľa pozorovania (v2) <sup>3</sup>	Výsledok podľa cyklu (v2.5) <sup>4</sup>	Výsledok podľa cyklu (v2) <sup>4</sup>
PPA pre SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA pre zavedenia	1056	100	100	100	98,9
PPA pre delécie	1056	95,2	95,2	>99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Počítané ako počet vzoriek v rámci cyklu × počet cyklov (96 vzoriek na jeden cyklus × 11 cyklov = 1056 pozorovaní).

<sup>2</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzoriek vo všetkých cykloch (11 cyklov so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzorky v rámci 1 cyklu (96 pozorovaní celkom).

<sup>4</sup>Najnižšia hodnota počas agregovanej analýzy údajov z každého cyklu.

## Somatic

Cieľom nasledujúcej štúdie bolo zhodnotiť správnosť volania variantu modulom Somatic Variant v prístroji NextSeq 550Dx použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Platinové genomické vzorky FFPE (dve s variantmi zriedenými na 0,05 VAF) boli testované pomocou reprezentatívnej analýzy.

Uskutočnilo sa celkom 11 cyklov použitím troch prístrojov NextSeq 550Dx a troch šarží súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

Správnosť bola stanovená pre SNV, zavedenia a delécie formou porovnania výsledkov s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou platinových genómov, verzia 2016-1.0. Výsledky správnosti z jedného cyklu referenčného spracovania so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) sú uvedené na referenčné účely. Súhrn výsledkov je uvedený v [Tabuľka 32](#).

Tabuľka 32 Súhrnné informácie o zhode – modul Somatic

Kritériá	Pozorovania celkom (v2.5) <sup>1</sup>	Výsledok podľa pozorovania (v2.5) <sup>2</sup>	Výsledok podľa pozorovania (v2) <sup>3</sup>	Výsledok podľa cyklu (v2.5) <sup>4</sup>	Výsledok podľa cyklu (v2) <sup>4</sup>
PPA pre SNV	528	100	100	100	100
PPA pre zavedenia	528	96,9	96,9	>99,9	>99,9
PPA pre delécie	528	100	100	100	100
NPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9
OPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Počítané ako počet vzoriek v rámci cyklu × počet cyklov (48 vzoriek na jeden cyklus × 11 cyklov = 528 pozorovaní).

<sup>2</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzoriek vo všetkých cykloch (11 cyklov so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzorky v rámci 1 cyklu (96 pozorovaní celkom).

<sup>4</sup>Najnižšia hodnota počas agregovanej analýzy údajov z každého cyklu.

## Presnosť

### Germline

Presnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) s modulom Germline Variant bola hodnotená použitím platinových genomických vzoriek a reprezentatívnej analýzy. Testovanie sa skladalo z prípravy jednej knižnice použitím súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a zahŕňalo 12 vzoriek spracovaných v rámci ôsmich replikátov (každá vzorka). Knižnice boli sekvenčne spracované použitím troch šarží súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) v troch prístrojoch NextSeq 550Dx, t. j. celkom sa uskutočnilo deväť cyklov sekvenčného spracovania.

Vzorky s heterozygotnými variantmi sa použili na určenie, či vnútorná variabilita analýzy ovplyvní volanie genotypu ( $n = 153$  jedinečných heterozygotných variantov). Hodnota Cx bola stanovená pre obidve hraničné hodnoty modulu Germline Variant (0,2 v prípade heterozygotných a 0,7 v prípade homozygotných genotypov), kde x predstavuje pomer opakovaných testov, ktorých hodnota presiahla hraničnú hodnotu. V prípade dolnej hraničnej hodnoty 0,2 VAF dosiahol variant s minimálnou hodnotou Cx pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) hodnotu > 99,9 %, čo znamená, že > 99,9 % heterozygotných variantov by bolo volaných ako heterozygotné. V prípade hornej hraničnej hodnoty 0,7 VAF dosiahol variant s maximálnou hodnotou Cx pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) hodnotu < 1,5 %, čo znamená, že  $\leq 1,5$  % heterozygotných variantov by bolo volaných ako homozygotné. [Tabuľka 33](#) obsahuje súhrn výsledkov podľa typu variantu. Hodnoty Cx z jedného cyklu sekvenčného spracovania použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) sú uvedené ako referencia.

Tabuľka 33 Hodnoty Germline Cx pre heterozygotné varianty

Typ variantu	N	Hraničná hodnota na úrovni 0,2 VAF		Hraničná hodnota na úrovni 0,7 VAF	
		Min. Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Min. Cx (v2) <sup>2</sup>	Max. Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Max. Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	>99,9 %	>99,9 %	1,5 %	1,0 %
Zavedenia	24	100 %	100 %	0 %	<0,1 %
Delécie	35	100 %	>99,9 %	<0,1 %	<0,1 %

<sup>1</sup>Hodnoty Cx založené na odhadoch celkovej štandardnej odchýlky z analýzy variabilných komponentov.

<sup>2</sup>Hodnoty Cx založené na štandardných odchýlkach vzoriek.

### Somatic

Presnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) s modulom Somatic Variant bola hodnotená použitím platinových genomických vzoriek FFPE a reprezentatívnej analýzy. Testovanie sa skladalo z prípravy jednej knižnice použitím súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a zahŕňalo dve vzorky spracované v rámci ôsmich replikátov (každá vzorka). Knižnice boli sekvenčne spracované použitím troch šarží súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) v troch prístrojoch NextSeq 550Dx, t. j. celkom sa uskutočnilo deväť cyklov sekvenčného spracovania.

Somatické varianty s očakávanými úrovňami VAF  $\leq 0,10$  VAF ( $m = 131$  jedinečných variantov) boli použité na hodnotenie variability prístroja v blízkosti hraničnej hodnoty VAF modulu Somatic Variant (somatické varianty s hladinou VAF  $\geq 0,026$  sa nazývajú pozitívne na variant). Pre každý zo somatického variantu boli určené hodnoty C95. Hodnoty C95 predstavujú úroveň VAF, na ktorej je pravdepodobnosť existencie vyššej hodnoty než je hraničná hodnota VAF modulu Somatic Variant 95 %. Najvyššie hodnoty C95 podľa typu variantu sú uvedené v [Tabuľka 34](#). Výsledky C95 z jedného cyklu sekvenčného spracovania použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) sú uvedené ako referencia.

Tabuľka 34 Súhm hodnôt C95 modulu Somatic

Typ variantu	Počet hodnotených variantov	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Zavedenia	24	0,062	0,061
Delécie	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>Hodnoty C95 založené na odhadoch celkovej štandardnej odchýlky z analýzy variabilných komponentov.

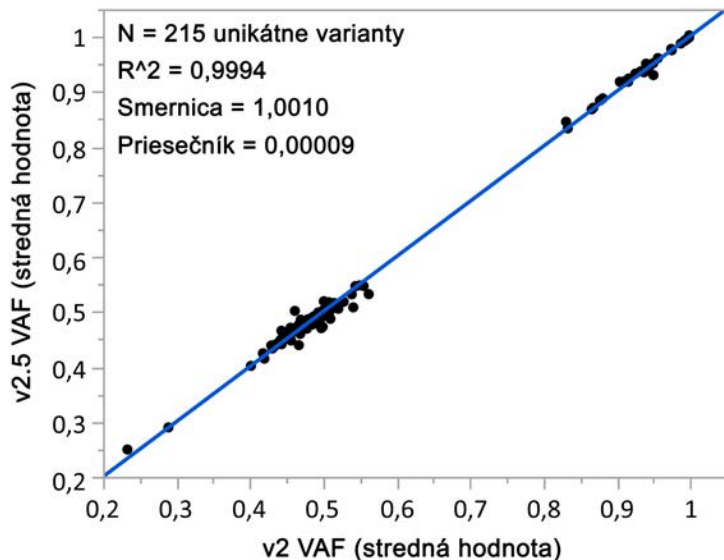
<sup>2</sup>Hodnoty C95 založené na štandardných odchýlkach vzoriek.

## Porovnanie metód (súprava reagensí)

### Germline

Priemerné hodnoty VAF z 215 jedinečných variantov boli hodnotené použitím súprav reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) s využitím výsledkov generovaných z modulu Germline Variant. Priemerné hodnoty VAF boli počítané z 11 cyklov sekvenčného spracovania (v2.5) a jedného cyklu sekvenčného spracovania (v2). Na výpočet priemernej hodnoty každého variantu bolo použitých najmenej osem replikátov. [Obrázok 3](#) uvádza koreláciu VAF medzi dvoma súpravami reagensí. Na základe silnej lineárnej korelácie VAF a podobnosti výsledkov medzi súpravami reagensí bolo stanovené, že charakteristiky účinnosti, ktoré boli na začiatku overené a validované pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a modulu Germline Variant, sa vzťahujú aj na súpravu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

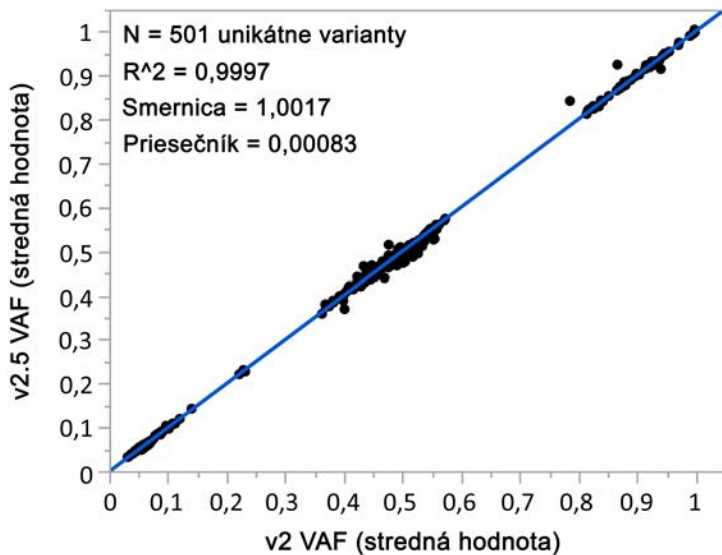
Obrázok 3 Korelácia frekvencie alel variantu (VAF) modulu Germline Variant medzi súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).



### Somatic

Priemerné hodnoty VAF 501 jedinečných variantov boli hodnotené použitím súprav reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) s využitím výsledkov generovaných z modulu Somatic Variant. Priemerné hodnoty VAF boli počítané z 11 cyklov sekvenčného spracovania (v2.5) a jedného cyklu sekvenčného spracovania (v2). Na výpočet priemernej hodnoty každého variantu bolo použitých najmenej osem replikátov. **Obrázok 4** uvádza koreláciu VAF medzi dvoma súpravami reagensí. Na základe korelácie VAF a podobnosti výsledkov medzi súpravami reagensí bolo stanovené, že charakteristiky účinnosti, ktoré boli overené a validované pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a modulu Somatic Variant, sa vzťahujú aj na súpravu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

Obrázok 4 Korelácia frekvencie alel variantu (VAF) modulu Somatic Variant medzi súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).



## História revízií

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000030326 v06	Máj 2022	Pridali sa aktualizácie opravujúce obsah, ktorý sa omylom pridal zo zdrojového softvéru.
Dokument č. 1000000030326 v05	November 2021	Pridalo sa vyhlásenie o upozorneniach a preventívnych opatreniach pri ohlasovaní závažných nehôd. Pridalo sa vyhlásenie k zásadám postupu, ktoré bližšie popisuje určeného používateľa. Odstránila sa referencia na súpravu reagensí High Output v2 (300 cyklov). Pridala sa referencia na súpravu reagensí High Output v2.5 (75 cyklov).
Dokument č. 1000000030326 v04	August 2021	Pridala sa tabuľka História revízií. Aktualizovala sa adresa autorizovaného zástupcu v Európskom spoločenstve.

## Patenty a ochranné známky

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 výrobku (výrobkov) 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 popísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATELOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBOK (VÝROBKY).

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

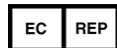
© 2022 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

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).

## Kontaktné informácie



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

## Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke [support.illumina.com](http://support.illumina.com).