

Modulo di analisi Local Run Manager CF Clinical Sequencing

Guida al flusso di lavoro

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Descrizione generale	3
Immissione delle informazioni della corsa	3
Metodi di analisi	5
Visualizzazione della corsa e dei risultati	5
Report dei risultati	5
Cronologia revisioni	8
Assistenza tecnica	9



Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IN CONTENUTE PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, MiSeqDx e la grafica del fluire delle basi sono marchi di fabbrica registrati o in attesa di brevetto di Illumina, Inc. e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

Descrizione generale

Il modulo di analisi Local Run Manager CF Clinical Sequencing è previsto per l'uso con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina. Il saggio rileva le mutazioni nelle regioni codificanti la proteina e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana (Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, *CFTR*), incluse due ampie delezioni e due mutazioni introniche profonde. Il modulo di analisi esegue l'analisi secondaria e genera un report con i dati ottenuti dalle corse di sequenziamento utilizzando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Vedere l'insero della confezione del *Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing* (documento n. 15038344).

Il modulo di analisi esamina regioni brevi di DNA amplificato, o ampliconi, rilevandone le varianti. Il sequenziamento mirato degli ampliconi consente l'elevata copertura di determinate regioni su un ampio numero di campioni.

Informazioni sulla guida

La presente guida fornisce istruzioni per l'impostazione dei parametri di una corsa per il sequenziamento e l'analisi sul modulo di analisi CF Clinical Sequencing. Per informazioni sul pannello di controllo e sulle impostazioni di sistema di Local Run Manager, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx* (documento n. 1000000011880).

Immissione delle informazioni della corsa

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Fare clic su **Create Run** (Crea corsa) e selezionare **CF Clinical**.
- 3 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini.
- 4 [Facoltativo] Immettere una descrizione per identificare la corsa.
Utilizzare caratteri alfanumerici.

Impostazione dei campioni per la corsa

Specificare i campioni per la corsa mediante una delle seguenti opzioni:

- ▶ **Immissione manuale dei campioni:** utilizzare la tabella vuota presente sulla schermata Create Run (Crea corsa).
- ▶ **Importazione dei campioni:** individuare un file esterno nel formato con valori separati da virgola (*.csv). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.


Dopo aver popolato la tabella dei campioni, è possibile esportare le informazioni sui campioni in un file esterno e utilizzare il file come riferimento quando si preparano le librerie o si importa il file per un'altra corsa.

Immissione manuale dei campioni

- 1 Immettere un nome del campione univoco nel campo Sample Name (Nome del campione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi.
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare i campioni di controllo positivo e negativo.
- 3 [Facoltativo] Immettere una descrizione del campione nella scheda Sample Description (Descrizione del

campione).


Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi.

- 4 [Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 1 dall'elenco a discesa Index 1 (i7) (Indice 1 - i7). Questo passaggio è facoltativo perché le combinazioni di indici i7 e i5 che popolano automaticamente i pozzetti soddisfano già i requisiti di diversità degli indici.
- 5 [Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Indice 2 - i5). Questo passaggio è facoltativo perché le combinazioni di indici i7 e i5 che popolano automaticamente i pozzetti soddisfano già i requisiti di diversità degli indici.
- 6 Fare clic sull'icona  **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 7 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 8 [Facoltativo] Fare clic su **Export** (Esporta) per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno.
- 9 Fare clic su **Save Run** (Salva corsa).

Importazione dei campioni

- 1 Fare clic su **Import Samples** (Importa campioni) e andare alla posizione in cui si trova il file contenente le informazioni sui campioni. Possono essere importati due tipi di file.
 - ▶ Fare clic su **Template** (Modello) sulla schermata Create Run (Crea corsa) per creare un nuovo layout della piastra. Il file modello contiene le intestazioni di colonna corrette per eseguire l'importazione. In ciascuna colonna, immettere le informazioni sui campioni da analizzare nella corsa. Eliminare le informazioni di esempio nelle caselle non utilizzate, quindi salvare il file.

Sample_Name	Description	I7_Index_ID	I5_Index_ID	Sample_Well	Control
Sample1		A701	A503	A01	
Sample2		A701	A504	A02	
Sample3		A701	A505	A03	
Sample4		A702	A503	A04	
Sample5		A702	A504	A05	
Sample6		A702	A505	A06	
Sample7		A710	A503	A07	Positive
Sample8		A710	A504	A08	Negative

- ▶ Utilizzare un file, contenente le informazioni sui campioni, che era stato esportato dal modulo CF Clinical Sequencing mediante la funzione Export (Esporta).
- 2 Fare clic sull'icona  **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
 - 3 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
 - 4 [Facoltativo] Fare clic su **Export** (Esporta) per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno.
 - 5 Fare clic su **Save Run** (Salva corsa).


Modifica di una corsa

Per istruzioni su come modificare le informazioni della corsa prima del sequenziamento, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)*.

Metodi di analisi

Per una descrizione dei metodi di analisi per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, vedere l'insero della confezione del *Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (documento n. 15038344)*.

Visualizzazione della corsa e dei risultati

- 1 Dal pannello di controllo di Local Run Manager, fare clic sul nome della corsa.
- 2 Dalla scheda Run Overview (Panoramica corsa), rivedere le metriche della corsa di sequenziamento.
- 3 [Facoltativo] Fare clic sull'icona **Copy to Clipboard** (Copia negli appunti)  per copiare il percorso della cartella contenente gli output della corsa.
- 4 Fare clic sulla scheda Sequencing Information (Informazioni sequenziamento) per rivedere i parametri della corsa e le informazioni relative ai materiali di consumo.
- 5 Fare clic sulla scheda Samples and Results (Campioni e risultati) per visualizzare la posizione del file dei risultati dell'analisi.
La scheda fornisce inoltre un elenco dei campioni che riepiloga la percentuale di identificazione, le prestazioni, le coordinate non identificate e le informazioni sui campioni di controllo.
 - Se l'analisi è stata ripetuta, espandere l'elenco a discesa Select Analysis (Seleziona analisi) e selezionare l'analisi appropriata.
- 6 [Facoltativo] Fare doppio clic nel campo Comment (Commento) per immettere un commento su un campione contenuto nell'elenco.
- 7 Selezionare i campioni nell'elenco per visualizzare le informazioni dettagliate sulle varianti.
Le informazioni sulle varianti dei campioni vengono visualizzate sotto l'elenco dei campioni.

Per maggiori informazioni sulle schede Run Overview (Panoramica corsa) e Sequencing Information (Informazioni sequenziamento) e su come rimettere in coda un'analisi, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)*.

Report dei risultati

Al termine dell'analisi secondaria, i risultati dell'analisi vengono riepilogati sulla scheda Samples and Results (Campioni e risultati). Per il saggio viene creato anche un file dei risultati dell'analisi (output) che riepiloga i risultati in un file di testo delimitato da tabulazioni chiamato MiSeqDxCFClinicalSequencingAssay.txt.

Informazioni sul campione

Tabella 1 Informazioni sull'elenco dei campioni

Intestazione colonna	Descrizione
Sample Name (Nome del campione)	Il nome del campione fornito al momento della creazione della corsa.
Sample ID (ID campione)	Il nome del campione fornito al momento della creazione della corsa, assieme all'ID dell'analisi assegnato dal software Local Run Manager. Se una corsa viene rimessa in coda, la parte contenente il nome del campione di Sample ID (ID campione) rimane invariata, mentre viene modificato l'ID dell'analisi. Questo campo si trova solo nel file *.txt.

Intestazione colonna	Descrizione
Sample Call Rate (Percentuale di identificazione dei campioni)	Il numero di posizioni delle varianti che soddisfano un valore di soglia di affidabilità predefinito diviso per il numero totale di posizioni delle varianti interrogate. La percentuale di identificazione viene descritta in base al singolo campione e riportata come una percentuale che viene calcolata come 1 meno [numero di posizioni delle varianti con identificazioni incomplete diviso per il numero totale di posizioni delle varianti sequenziate].
Performance (Prestazioni)	Frequenza di Pass (Superato) o Fail (Non superato) in base alla percentuale di identificazione. Per un campione di controllo positivo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato): con una percentuale di identificazione $\geq 99\%$ • FAIL (Non superato): con una percentuale di identificazione $< 99\%$ Per un campione di controllo negativo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato): con una percentuale di identificazione $\leq 10\%$ • FAIL (Non superato): con una percentuale di identificazione $> 10\%$ Per un campione non marcato come controllo positivo o negativo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato): con una percentuale di identificazione $\geq 99\%$ • FAIL (Non superato): con una percentuale di identificazione $< 99\%$
Control (Controllo)	Il tipo di campione di controllo fornito al momento della creazione della corsa. I valori sono positivi o negativi. Un campo vuoto indica solo campione.
Comment (Commento)	Campo di testo facoltativo per i commenti. Per immettere un commento, fare doppio clic nel campo del commento. I commenti inseriti in questo campo vengono salvati nel file report dell'analisi, MiSeqDxCFClinicalSequencingAssay.txt. Se l'analisi viene rimessa in coda, viene scritto un nuovo file report. I commenti della corsa di un'analisi precedente non vengono riportati nella corsa dell'analisi successiva.
Coordinates Not Called (Coordinate non identificate)	Le coordinate genomiche nella regione target in cui un'identificazione non è stata riportata a causa di bassi valori di affidabilità.

Informazioni sulla variante del campione

Tabella 2 Tabella delle varianti

Intestazione colonna	Descrizione
Variant Type (Tipo di variante)	Tipo di variante. <ul style="list-style-type: none"> • SNV: variante di singolo nucleotide • DIV: variante inserzione delezione • DEL: ampia delezione. • PolyTGPolyT: genotipo PolyTG/PolyT nel gene CF
Posizione Coordinate (Coordinata)	Posizione genomica in cui si è stata trovata la variante. Nel file *.txt il nome del campo è Coordinate (Coordinata).
Chr (Crom) Cromosoma	ID del cromosoma di riferimento. Nel file *.txt il nome del campo è Chromosome (Cromosoma).
Frequency (Frequenza)	Frazione di letture per il campione che include la variante. Per esempio, se la base di riferimento in una determinata posizione è A e il campione 1 ha 60 letture A e 40 letture T, allora la SNV ha una frequenza di variante pari a 0,4.
Depth (Profondità)	Numero di letture per un campione che copre una determinata posizione.
cDNA Name (HGVS) (Nome cDNA - HGVS)	Descrizione di una variante a livello di DNA mediante la nomenclatura della sequenza di DNA codificante (cDNA) raccomandata dalla Human Genome Variation Society (HGVS).
Protein Name (HGVS) (Nome proteina - HGVS)	Descrizione di una variante a livello di proteina mediante la nomenclatura della sequenza proteica raccomandata dalla Human Genome Variation Society (HGVS).

Intestazione colonna	Descrizione
dbSNP dbSNP ID (ID dbSNP)	Nome dbSNP della variante. Nel file *.txt il nome del campo è dbSNP ID (ID dbSNP).
RefGene Reference (Riferimento)	La base di riferimento alla coordinata genomica alla quale viene rilevata la variante. Nel file *.txt il nome del campo è Reference (Riferimento).
Call Result (Risultato identificazione)	Genotipo della variante. <ul style="list-style-type: none"> • SNV o DIV: la descrizione dei due alleli osservati. Ad esempio, A/T descrive una SNV dove sono stati osservati entrambi gli alleli A e T ed è Heterozygous (Eterozigote). L'allele wild type viene elencato per primo, seguito dall'allele della variante. • Small Deletions (Delezioni piccole): l'allele della variante descrive l'allele con la delezione. Ad esempio, ATCT/A. • Insertions (Inserzioni): l'allele della variante descrive l'allele con l'inserzione. Ad esempio, C/CT. • DEL (Delezione): il risultato viene riportato come Het Deletion (Delezione eterozigote) o Hom Deletion (Delezione eterozigote). • PolyTGPolyT: l'effettivo genotipo riportato. Nel file *.txt il nome del campo è Result (Risultato).
Interpretation (Interpretazione)	Questo campo consente al genetista di fornire un'interpretazione clinica della mutazione di ogni campione. Fare doppio clic sulla colonna Interpretation (Interpretazione) per modificare il valore. Per salvare le modifiche apportate alla colonna Interpretation (Interpretazione), selezionare l'icona Save Changes (Salva modifiche). L'elenco a discesa Interpretation (Interpretazione) comprende le seguenti opzioni: <ul style="list-style-type: none"> • CF (Cystic fibrosis): che causa la fibrosi cistica • MVCC (Mutation of Varying Clinical Consequence): mutazione di varie conseguenze cliniche • MOUS (Mutation of Unknown Significance): mutazione con significato sconosciuto • NCFCM (Non CF Causing Mutation): mutazione che non causa la fibrosi cistica • Unknown (Sconosciuta)
Filter (Filtro)	Criterio per una variante filtrata. Questo campo non è presente nel file *.txt.

File dei risultati dell'analisi

I risultati contenuti nel file dei risultati dell'analisi sono identici a quelli contenuti nella scheda Samples and Results (Campioni e risultati). Vedere [Informazioni sul campione a pagina 5](#) e [Informazioni sulla variante del campione a pagina 6](#).

- Scegliere una delle seguenti opzioni per visualizzare il file dei risultati dell'analisi MiSeqDxCFClinicalSequencingAssay.txt.
 - ▶ Dalla scheda Samples and Results (Campioni e risultati), fare clic su **Export Data** (Esporta dati).
 - ▶ Aprire il file contenuto nella cartella Alignment (Allineamento).
Il percorso per la cartella Alignment (Allineamento) viene visualizzato nella scheda Samples and Results (Campioni e risultati) nel campo Analysis Folder (Cartella analisi).
Una volta completata l'analisi, il file dei risultati dell'analisi viene scritto nella cartella Alignment (Allineamento) relativa alla corsa.
Ad esempio: MiSeqAnalysis\X rappresenta Run ID (ID corsa). AAAAMMGG è la data della corsa. N è un numero sequenziale che aumenta quando l'analisi viene ripetuta o rimessa in coda.

Tabella 3 Intestazione del file MiSeqDxCF139VariantAssay.txt

Intestazione colonna	Descrizione
Test (Analisi)	Descrive il test eseguito.
Run ID (ID corsa)	L'ID della corsa generato da MiSeq Operating Software (MOS) all'avvio della corsa di sequenziamento.
Run Date (Data della corsa)	Data (GGMMAA) in cui la corsa di sequenziamento ha avuto inizio in MOS.
Analysis Version (Versione analisi)	La versione del modulo di analisi Local Run Manager CF Clinical Sequencing utilizzato per l'analisi.

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 1000000010786 v01	Aprile 2020	Aggiornati gli indirizzi dei rappresentanti autorizzati nell'Unione Europea. Aggiornato l'indirizzo dello sponsor Australiano.
Documento n. 1000000010786 v00	Agosto 2017	Versione iniziale.

Assistenza tecnica

Per l'assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Sito Web: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

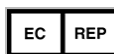
Area geografica	Gratuito	Regionale
Nord America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	400.635.9898	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940	+49 8938035677
Giappone	0800.111.5011	
Hong Kong	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Norvegia	+47 800 16836	+47 21939693
Nuova Zelanda	0800.451.650	
Paesi Bassi	+31 8000222493	+31 207132960
Regno Unito	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapore	+1.800.579.2745	
Spagna	+34 911899417	+34 800300143
Svezia	+46 850619671	+46 200883979
Svizzera	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	00806651752	
Altri paesi	+44.1799.534000	

Schede dei dati di sicurezza (SDS): sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione dei prodotti: la documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito Web Illumina. Andare al sito support.illumina.com, selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Freddy van Riemsdijkweg 15
5657 EE Eindhoven
Paesi Bassi

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

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®