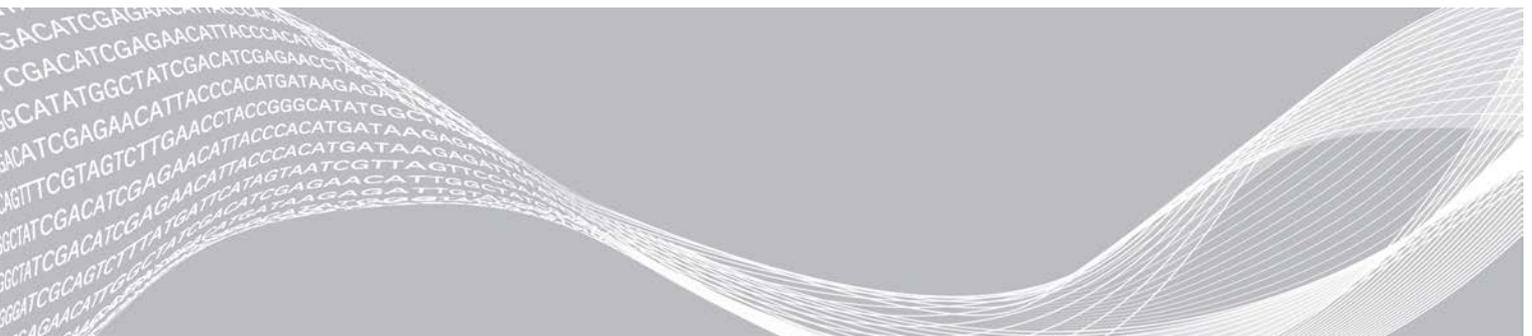


Modulo di analisi Local Run Manager CF 139 Variant

Guida al flusso di lavoro

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

| | |
|---|---|
| Descrizione generale | 3 |
| Immissione delle informazioni per la 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 139 Variant è previsto per l'uso con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina. Il saggio rileva 139 mutazioni rilevanti che causano la fibrosi cistica e le varianti del gene regolatore della conduttanza transmembrana (Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, *CFTR*) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero periferico umano. Il modulo di analisi esegue l'analisi secondaria e genera report con i dati ottenuti dalle corse di sequenziamento utilizzando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant. Vedere l'insero della confezione del *Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant (documento n. 15038347)*.

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 139 Variant. Per informazioni sul pannello di controllo e sulle impostazioni di sistema di Local Run Manager, vedere la *Guida di riferimento del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)*.

Immissione delle informazioni per la corsa

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Fare clic su **Create Run** (Crea corsa) e selezionare **CF 139**.
- 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

- 1 Selezionare il numero di campioni dal menu a discesa Number of Samples (Numero di campioni). Prendere in considerazione le seguenti informazioni quando si effettua una selezione.
 - Scegliere il numero di campioni che più si avvicina al numero di campioni da analizzare. L'elenco a discesa contiene i campioni in multipli di 8. Se il numero esatto di campioni non è presente nell'elenco, selezionare il numero che più vi si avvicina, ma che sia inferiore al numero di campioni da analizzare, in questo modo vengono soddisfatti i requisiti per la diversità dell'indice. Ad esempio, se si desidera analizzare 18 campioni, selezionare 16 campioni. Quindi aggiungere due ulteriori campioni. Assicurarsi di selezionare gli adattatori indice per i pozzetti in più.
 - Per 48 campioni, sono disponibili due diverse configurazioni. Una configurazione è 48-Set 1 e l'altra è 48-Set 2. I set di configurazione contengono diversi primer indice i7 e diverse posizioni di pozzetti. Questi set possono essere utilizzati per impostare due corse di sequenziamento per un totale di 96 campioni.

- 2 Utilizzare la tabella vuota presente sulla schermata Create Run (Crea corsa). Sono evidenziati i pozzetti di campione suggeriti.
- **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 Description (Descrizione). 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 indici i7 e i5 che popolano automaticamente i pozzetti evidenziati già soddisfano i requisiti per la diversità indice.
- 5 [Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Index 2 - i5). Questo passaggio è facoltativo perché le combinazioni indici i7 e i5 che popolano automaticamente i pozzetti evidenziati già soddisfano i requisiti per la diversità indice.
- 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 | A503 | A02 | |
| Sample3 | | A701 | A504 | A03 | |
| Sample4 | | A702 | A504 | A04 | |
| Sample5 | | A702 | A505 | 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 139 Variant 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 riferimento 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 139-Variant, vedere l'insero della confezione del *Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant (documento n. 15038347)*.

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 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 riferimento 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 MiSeqDxCf139VariantAssay.txt.

Informazioni sui campioni

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. |
| 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 di $\geq 99\%$ • FAIL (Non superato): con una percentuale di identificazione di $< 99\%$ Per un campione di controllo negativo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato): con una percentuale di identificazione di $\leq 10\%$ • FAIL (Non superato): con una percentuale di identificazione di $> 10\%$ Per un campione non marcato come controllo positivo o negativo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato): con una percentuale di identificazione di $\geq 99\%$ • FAIL (Non superato): con una percentuale di identificazione di $< 99\%$ |
| 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, MiSeqDxCf139VariantAssay.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. |

Informazioni sulle varianti dei campioni

Tabella 2 Tabella delle varianti

| Intestazione colonna | Descrizione |
|---|---|
| Mutations Name (Nome mutazione) Mutations (Common Name) [Mutazione (Nome comune)] | Nome comune della variante della fibrosi cistica descritta nel database CFTR2. Il nome del campo è Mutations (Common Name) (Mutazione - Nome comune) nel file *.txt. |
| Mutations Type (Tipo mutazione) | 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 |
| dbSNP rsID (ID dbSNP rs) | ID dbSNP rs della variante, se applicabile. |
| CFTR Gene Region (Regione del gene CFTR) | Regione del gene CFTR (n. esone o n. introne) in cui è presente la variante. |

| Intestazione colonna | Descrizione |
|---|---|
| Genomic Location (Posizione genomica) | Posizione genomica della variante nel cromosoma 7. |
| cDNA Name (Nome cDNA) cDNA Name (HGVS) (Nome cDNA - HGVS) | Descrizione della variante a livello di DNA mediante la nomenclatura della sequenza di DNA codificante (cDNA) raccomandata dalla Human Genome Variation Society (HGVS). Il nome del campo è cDNA Name (HGVS) (Nome cDNA - HGVS) nel file *.txt. |
| Protein Name (Nome proteina) 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). Il nome del campo è Protein Name (HGVS) (Nome proteina - HGVS) nel file *.txt. |
| Result (Risultato) | Genotipo della variante. Per le varianti SNV, DIV e DEL: <ul style="list-style-type: none"> • HET: eterozigosi • HOM: omozigosi Per le varianti PolyTG/PolyT, viene riportato il genotipo effettivo. NOTA: PolyTG/PolyT è riportato solo quando viene rilevata la variante R117H. |

File dei risultati dell'analisi

I risultati contenuti nel file dei risultati dell'analisi sono identici a quelli contenuti nella scheda Sample and Results (Campione e risultati). Vedere [Informazioni sui campioni a pagina 6](#) e [Informazioni sulle varianti dei campioni a pagina 6](#).

- Scegliere una delle seguenti opzioni per visualizzare il file dei risultati dell'analisi MiSeqDxCf139VariantAssay.txt.
 - ▶ Dalla scheda Sample and Results (Campione 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 Sample and Results (Campione 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). YYYYMMDD 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) | La 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 139 Variant utilizzato per l'analisi. |

Cronologia revisioni

| Documento | Data | Descrizione della modifica |
|-----------------------------------|----------------|--|
| Documento n. 1000000012184 v01 | Avril 2020 | <p>Aggiornati gli indirizzi dei rappresentanti autorizzati nell'Unione Europea. Aggiornato l'indirizzo dello sponsor Australiano. Modificato il nome della sezione Report dell'analisi in Report dei risultati. Aggiunte le informazioni sulle differenze relative al nome del campo tra il software Local Run Manager e il file *.txt nelle sezioni Informazioni sui campioni e Informazioni sulle varianti dei campioni. Aggiunta una descrizione dell'ID campione. Rimosse le informazioni della sezione Metodi di analisi. I metodi di analisi sono descritti nei dettagli nell'insero della confezione del <i>Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant (documento n. 15038347)</i>. Nella sezione Impostazione dei campioni per la corsa, aggiunte le informazioni che set 1 e set 2 della configurazione a 48 campioni può essere utilizzata per 96 campioni e due corse di sequenziamento. Nella sezione Immissione manuale dei campioni, rivisto quanto segue:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Modificata la fase 1 da ID campione a nome del campione per coerenza con il software. • Modificata la fase 2 per indicare che sono richiesti i campioni di controllo positivo e negativo. • Modificata la fase 3 per indicare che non possono essere utilizzati gli spazi per la descrizione dei campioni. <p>Spostata la sezione Informazioni su come modificare una corsa nella <i>Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)</i>. Nella tabella contenente gli esempi della sezione Importazione dei campioni, aggiunti gli zero di fronte ai numeri nelle colonne Sample_Well (Pozzetto_Campione). Sebbene sia possibile creare un file di importazione dei campioni che non contenga zeri iniziali nella colonna, la tabella è ora coerente con il modello fornito dal software. Nella sezione File dei risultati dell'analisi, aggiunte le informazioni sulla denominazione della cartella Alignment (Allineamento) indicando che N è un numero sequenziale che aumenta se l'analisi viene ripetuta o rimessa in coda. Aggiunta la presente Cronologia revisioni.</p> |
| Documento n. 1000000012184 v00 | Giugno 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®