

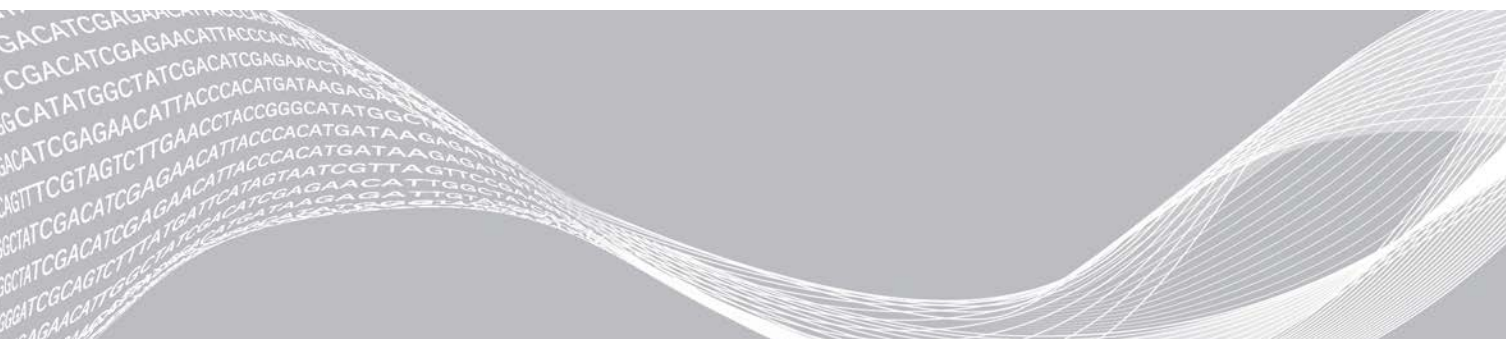
Local Run Manager

DNA GenerateFASTQ Dx Analysis Module

Guida al flusso di lavoro per MiSeqDx

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	6
Report dei risultati	6
File di output dell'analisi	7
Cronologia revisioni	11
Assistenza Tecnica	12



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 POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

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

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.

Descrizione generale

Il Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx module effettua per prima cosa il demultiplex delle letture indici. Se presente, DNA GenerateFASTQ Dx crea i file di output intermedi nel formato di file FASTQ, quindi esce dal flusso di lavoro. Non viene effettuato alcun allineamento, né altre analisi. I file FASTQ rappresentano l'input richiesto per l'analisi con strumenti analitici di altri produttori.

Il Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx module può essere eseguito su Local Run Manager v3.1.0 (o versione successiva) ed è compatibile con Windows 10. Il modulo di analisi supporta il processo dal sequenziamento all'analisi per il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina.

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 DNA GenerateFASTQ Dx. L'utilizzo del software richiede conoscenze di base dell'attuale sistema operativo Windows e dell'interfaccia utente basata sul browser Web. 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. 200003931)*.

Immissione delle informazioni per la corsa

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Selezionare **Create Run** (Crea corsa), quindi selezionare **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Immettere un nome univoco che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi (massimo 40 caratteri).
Il nome della corsa può contenere caratteri alfanumerici, spazi e i caratteri speciali: `~!@#\$\$%-_{}`.
Non è possibile utilizzare lo stesso nome di una corsa precedente.
- 4 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione per identificare la corsa (massimo 150 caratteri).
La descrizione della corsa può contenere caratteri alfanumerici, spazi e i seguenti caratteri speciali: `~!@#\$\$%-_{}`.
- 5 Configurare le seguenti impostazioni della corsa:
 - ▶ **Index Plate (Piastra indici):** selezionare il layout della piastra indici utilizzata durante la preparazione delle librerie. È possibile selezionare Index Set A (Set indici A), Index Set B (Set indici B) o Index Set AB (Set indici AB). Per maggiori informazioni sui layout delle piastre indici, vedere *l'insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina*.
I set indici A e B contengono 96 campioni e i corrispondenti primer doppi univoci (UDP, Unique Dual Primer). Il set indici AB contiene 192 campioni e i corrispondenti UDP.
 - ▶ **Read Type (Tipo lettura):** selezionare lettura singola o paired-end. Il tipo di lettura predefinito è paired-end.
 - ▶ **Read Lengths (Lunghezze lettura):** immettere la lunghezza della lettura. La lunghezza predefinita per la lettura è 151.
- 6 In **Module-Specific Settings** (Impostazioni specifiche dei moduli), impostare l'opzione **Adapter Trimming** (Trimming adattatore).
Per impostazione predefinita, il trimming adattatore è abilitato.

- 7 Selezionare il numero di campioni da sequenziare. Il numero di campioni selezionato include i suggerimenti UDP popolati automaticamente. Se non si desidera utilizzare i suggerimenti UDP, selezionare **Custom** (Personalizzato).
Se il numero di campioni di cui si sta effettuando il sequenziamento non è incluso nell'elenco a discesa, selezionare il numero di campioni più prossimo. Assicurarsi che il numero selezionato sia inferiore rispetto al numero da sequenziare e di aggiungere eventuali UDP secondo necessità. Ad esempio, se si desidera analizzare 18 campioni, selezionare l'opzione per 16 campioni.

Specificare i campioni per la corsa

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

- ▶ **Enter samples manually** (Immissione manuale dei campioni): utilizzare la tabella vuota che si trova nella schermata Create Run (Crea corsa).
- ▶ **Import samples** (Importazione dei campioni): individuare un file esterno il cui formato presenti valori separati da virgola (*.csv). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.

Immissione manuale dei campioni

- 1 Immettere un ID campione univoco nella scheda Sample ID (ID campione). Utilizzare caratteri alfanumerici e/o trattini (massimo 40 caratteri).
L'ID campione, la corrispondente descrizione del campione e la posizione UDP sono evidenziate in blu, a indicare che il campione è stato immesso.
- 2 **[Facoltativo]** Per i campioni di controllo positivi o negativi, fare clic con il pulsante destro del mouse sui pozzetti dei campioni.
- 3 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione del campione nella scheda Sample Description (Descrizione del campione). La descrizione del campione può contenere caratteri alfanumerici, spazi e i caratteri speciali `~!@#\$\$%-_{}
Se l'ID campione associato alla descrizione del campione viene utilizzato nuovamente in una corsa successiva, la prima descrizione del campione viene sovrascritta.
- 4 Modificare le posizioni UDP suggerite secondo necessità. Le posizioni dei pozzetti dei campioni suggeriti sono evidenziate in giallo, viola, arancione e rosa.
Se si utilizzano i pozzetti campione suggeriti, il software popola automaticamente gli adattatori di indice UDP che soddisfano i requisiti di diversità d'indice. Se il numero di campioni selezionato non corrisponde al numero esatto di campioni da analizzare, assicurarsi di selezionare gli adattatori di indice UDP per i pozzetti in più.
- 5 **[Facoltativo]** Selezionare **Export Samples** (Esporta campioni) per il file delle informazioni dei campioni.
- 6 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).

Importazione di un foglio campioni

È possibile importare le informazioni dei campioni da un file contenente informazioni dei campioni precedentemente esportato dal DNA GenerateFASTQ Dx module tramite la funzione Export Samples (Esporta campioni) o tramite un file modello, che può essere creato selezionando l'opzione **Template** (Modello) sulla schermata Create Run (Crea corsa). Per istruzioni su come creare ed esportare le informazioni dei campioni, vedere *Immissione manuale dei campioni a pagina 4*.

Il file modello non include i suggerimenti UDP popolati automaticamente.

Per modificare un file modello:

- 1 Selezionare **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. Modificare il file nel modo seguente:
 - a Aprire il foglio campioni in un editor di testo.
 - b Immettere le informazioni richieste per il campione.
 - c Salvare il file in formato di testo con valori separato da virgola (*.csv). Assicurarsi che gli ID dei campioni siano univoci.

Per importare le informazioni dei campioni:

- 2 Selezionare **Import Samples** (Importa campioni), quindi selezionare il file CSV.
- 3 **[Facoltativo]** Selezionare **Export** (Esporta) per esportare le informazioni dei campioni in un file esterno.
- 4 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).

Modifica di una corsa

Per istruzioni su come modificare le informazioni della corsa prima del sequenziamento, fare riferimento alla *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 200003931)*.

Metodi di analisi

Il modulo di analisi DNA GenerateFASTQ Dx esegue la seguente procedura di analisi, quindi scrive i file di output dell'analisi nella cartella Alignment (Allineamento).

- ▶ Esegue il demultiplex delle letture indici
- ▶ Genera i file FASTQ

Demultiplex

Il demultiplex confronta ogni sequenza Index Read (Lettura indici) sulle sequenze indici specificate per la corsa. In questa fase non vengono considerati i valori qualitativi.

Le letture indici vengono identificate tramite le seguenti fasi:

- ▶ I campioni sono numerati a partire da 1 in base all'ordine in cui sono stati elencati per la corsa.
- ▶ Il numero del campione 0 è riservato ai cluster non assegnati a un campione.
- ▶ I cluster sono assegnati a un campione quando la sequenza d'indice corrisponde esattamente o quando è presente una sola mancata corrispondenza per Index Read (Lettura indici).

Generazione di file FASTQ

Al termine del demultiplex, il software genera i file dell'analisi intermedia in formato FASTQ, un formato di testo utilizzato per rappresentare le sequenze. I file FASTQ contengono le letture per ogni campione e i punteggi qualitativi associati. Sono esclusi tutti i controlli utilizzati per la corsa e i cluster che non superano il filtro.

Ogni file FASTQ contiene le letture per un solo campione e il nome di quel campione è incluso nel nome del file FASTQ. I file FASTQ rappresentano gli input principali per l'allineamento.

Visualizzazione della corsa e dei risultati

- 1 Nel pannello di controllo di Local Run Manager, selezionare il nome della corsa.
- 2 Nella scheda Run Overview (Panoramica corsa), rivedere le metriche della corsa di sequenziamento.
- 3 Per modificare la posizione dei file dei dati dell'analisi per un'eventuale rimessa in coda della corsa selezionata, selezionare **Edit** (Modifica) e modificare il percorso del file della cartella di output della corsa. Non è possibile modificare il nome della cartella di output della corsa.
- 4 **[Facoltativo]** Selezionare **Copy to Clipboard** (Copia negli appunti) per copiare il percorso del file della cartella di output della corsa.
- 5 Selezionare la scheda Sequencing Information (Informazioni sequenziamento) per rivedere i parametri della corsa e le informazioni relative ai materiali di consumo.
- 6 Selezionare la scheda Samples and Results (Campioni e risultati) per visualizzare il report dell'analisi.
 - ▶ Se l'analisi è stata rimessa in coda, selezionare l'analisi appropriata dall'elenco a discesa Select Analysis (Seleziona analisi).
 - ▶ Dalla barra di navigazione sinistra, selezionare un ID campione per visualizzare il report per un altro campione.
- 7 **[Facoltativo]** Selezionare **Copy to Clipboard** (Copia negli appunti) per copiare il percorso del file della cartella dell'analisi.

Report dei risultati

I risultati vengono riepilogati sulla scheda Samples and Results (Campioni e risultati).

Campioni

Tabella 1 Tabella campioni

Intestazione colonna	Descrizione
ID campione	L'ID del campione fornito al momento della creazione della corsa.
Piastra	Piastra fornita con la piastra di indici al momento di creazione della corsa. La colonna viene mostrata solo se è stata selezionata la piastra di indici AB.
Pozzetto indice	Pozzetto indice fornito con la posizione del pozzetto del campione al momento di creazione della corsa.
Descrizione	Descrizione del campione fornita al momento di creazione della corsa.
UDP	UDP utilizzato con il campione.
Controllo	Controllo positivo o negativo utilizzato con il campione.

Indicizzazione

Tabella 2 Tabella di indicizzazione

Intestazione colonna	Descrizione
Numero di indice	ID assegnato basato sull'ordine in cui i campioni vengono elencati nella tabella dei campioni.
ID campione	L'ID del campione fornito al momento della creazione della corsa.

Intestazione colonna	Descrizione
UDP	UDP utilizzato con il campione.
% di letture identificate (PF)	Percentuale di letture che hanno superato i filtri.

File di output dell'analisi

Per il modulo di analisi DNA GenerateFASTQ Dx vengono creati i seguenti file di output dell'analisi.

Nome file	Descrizione
Demultiplex (*.demux)	File intermedi che contengono un riepilogo dei risultati del demultiplex.
FASTQ (*.fastq.gz)	File intermedi che contengono le identificazioni delle basi qualitativamente valutate. I file FASTQ rappresentano gli input principali per la fase di allineamento.

Formato file per il demultiplex

Il processo di demultiplex legge la sequenza d'indice collegata a ogni cluster per determinare il campione da cui è stato originato il cluster. La mappatura tra i cluster e il numero di campione viene scritta su un file di demultiplex (*.demux) per ogni tile della cella a flusso.

Il file di demultiplex è nel formato **s_1_X.demux**, dove X rappresenta il numero della tile.

I file di demultiplex iniziano con un'intestazione:

- ▶ Versione (valore intero di 4 byte), attualmente 1
- ▶ Conteggio dei cluster (valore intero di 4 byte)

Il resto del file consiste di numeri dei campioni per ogni cluster della tile.

Al termine della fase di demultiplex, il software genera un file di demultiplex chiamato **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ Nel nome del file, **F1** rappresenta il numero della cella a flusso.
- ▶ Nel nome del file, **L1** rappresenta il numero della corsia.
- ▶ Il demultiplex produce una tabella con una riga per tile e una colonna per campione, incluso il campione 0.
- ▶ Le sequenze più frequenti nelle letture indici.

Formato file FASTQ

FASTQ è un formato file di testo che contiene le identificazioni delle basi e i valori qualitativi per ogni lettura. Ciascun record contiene quattro righe:

- ▶ L'identificatore
- ▶ La sequenza
- ▶ Un segno più (+)
- ▶ I punteggi qualitativi su scala Phred in un formato codificato ASCII + 33

L'identificatore è formattato nel seguente modo:

@Strumento:IDCorsa:IDCellaafusso:Corsia:Tile:X:Y NumLettura:IndicatoreFiltro:0:NumeroCampione

Esempio:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAA9#:<#<;<<<????#=#
```

File di output supplementari

I seguenti file di output forniscono informazioni supplementari o riepilogano i risultati della corsa e gli errori dell'analisi. Sebbene questi file non siano richiesti per valutare i risultati dell'analisi possono essere utilizzati per la risoluzione dei problemi. Tutti i file si trovano nella cartella Alignment (Allineamento), se non diversamente indicato.

Nome file	Descrizione
AdapterTrimming.txt	Elenca il numero di basi sottoposte a trimming e la percentuale di basi per ogni tile. Questo file è presente solo se per la corsa è stato specificato il trimming adattatore.
AnalysisLog.txt	Registro dell'elaborazione che descrive tutte le fasi che si sono verificate durante l'analisi della cartella della corsa attuale. Questo file non contiene messaggi di errore. Si trova a livello della radice della cartella della corsa.
AnalysisError.txt	Registro dell'elaborazione che elenca eventuali errori verificatisi durante l'analisi. Questo file sarà vuoto se non si è verificato alcun errore. Si trova a livello della radice della cartella della corsa.
CompletedJobInfo.xml	Questo file viene creato dopo il completamento dell'analisi e contiene informazioni sulla corsa, come data, ID della cella a flusso, versione del software e altri parametri. Si trova a livello della radice della cartella della corsa.
Checksum.csv	Contiene i nomi dei file e i valori checksum univoci per i file FASTQ determinati e non determinati, i file BCL e il file SampleSheetUsed.csv .
DemultiplexSummaryF1L1.txt	Riporta i risultati di demultiplex in una tabella con una riga per ogni tile e una colonna per ogni campione.
GenerateFASTQRunStatistics.xml	Contiene un riepilogo delle statistiche specifiche per la corsa. Si trova a livello della radice della cartella della corsa.

Cartella dell'analisi

La cartella dell'analisi contiene i file generati dal software Local Run Manager.

La relazione tra la cartella di output e la cartella dell'analisi è riepilogata qui di seguito:

- ▶ Durante il sequenziamento, Real-Time Analysis (RTA) popola la cartella di output con i file generati durante l'analisi delle immagini, l'identificazione delle basi e il calcolo del punteggio qualitativo.
- ▶ RTA copia i file nella cartella dell'analisi in tempo reale. Dopo che RTA ha assegnato un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo, il software scrive il file RTAComplete.xml in entrambe le cartelle.
- ▶ L'analisi viene avviata quando è presente il file RTAComplete.xml.

- ▶ Durante l'analisi, Local Run Manager scrive i file di output nella cartella dell'analisi, quindi copia nuovamente i file nella cartella di output.

Cartelle per l'allineamento

Ogni volta che un'analisi viene rimessa in coda, Local Run Manager crea una cartella Alignment (Allineamento) chiamata **Alignment_N**, dove N rappresenta un numero sequenziale.

Struttura della cartella

- 📁 Dati
- 📁 Alignment_## or Alignment_Imported_##
 - 📁 [Data e ora della corsa]
 - 📁 DataAccessFiles
 - 📁 Fastq
 - 📁 FastqSummaryF1L1.txt
 - 📁 Sample1_S1_L001_R1_001.fastq.gz
 - 📁 Sample2_S2_L001_R2_001.fastq.gz
 - 📁 Undetermined_S0_L001_R1_001.fastq.gz
 - 📁 Undetermined_S0_L001_R2_001.fastq.gz
 - 📁 Logging
 - 📁 BuildFastq0.stdout.txt
 - 📁 BuildFastq1.stdout.txt
 - 📁 commands.txt
 - 📁 Plots
 - 📁 AdapterCounts.txt
 - 📁 AdapterTrimming.txt
 - 📁 AnalysisError.txt
 - 📁 AnalysisLog.txt
 - 📁 Checkpoint.txt
 - 📁 Checksum.csv
 - 📁 CompletedJobInfo.xml
 - 📁 DemultiplexSummaryF1L1.txt
 - 📁 GenerateFASTQRunStatistics.xml
 - 📁 SampleSheetUsed.csv

Identificazione delle basi e diversità d'indice

Quando i campioni vengono sequenziati sullo strumento MiSeqDx, l'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ogni cluster di una data tile, o un'area di imaging sulla cella a flusso, a un determinato ciclo. Lo strumento MiSeqDx utilizza il sequenziamento a quattro canali, che richiede quattro immagini per codificare i dati per quattro basi di DNA, due immagini dal canale rosso e due immagini dal canale verde.

La procedura di identificazione delle basi per le letture indici è diversa rispetto all'identificazione delle basi durante altre letture.

Quando, durante la creazione della corsa, si selezionano gli indici viene visualizzato un avviso di bassa diversità se gli indici non soddisfano i requisiti di diversità. Per impedire la visualizzazione dell'avviso di bassa diversità, selezionare le sequenze indici che forniscono un segnale in entrambi i canali per ogni ciclo.

- ▶ Canale rosso: A o C
- ▶ Canale verde: G o T

Questa procedura di identificazione delle basi garantisce l'accuratezza quando si analizzano campioni con basso plex. Per maggiori informazioni sulle sequenze degli indici, vedere *l'insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina*.

Durante la creazione della corsa in Local Run Manager è possibile scegliere il numero di campioni da analizzare. Le combinazioni indici suggerite che soddisfano i requisiti della diversità d'indice vengono popolate automaticamente dal software. Sebbene non sia richiesto utilizzare le combinazioni indici suggerite, l'utilizzo è raccomandato.

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 200015661 v01	Maggio 2022	Aggiunto l'indirizzo dello sponsor australiano. Chiarita la limitazione per la descrizione del campione.
Documento n. 200015661 v00	Febbraio 2022	Versione iniziale

Assistenza Tecnica

Per ricevere 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 8008094566	
Australia	+1 800775688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	4000665835	
Corea del Sud	+82 802345300	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940	+49 8938035677
Giappone	08001115011	
Hong Kong, Cina	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Norvegia	+47 800 16836	+47 21939693
Nuova Zelanda	0800451650	
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, Cina	00806651752	
Altri paesi	+44.1799.534000	

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

Documentazione sul prodotto: disponibile per il download all'indirizzo support.illumina.com.



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

CE



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK 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

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®