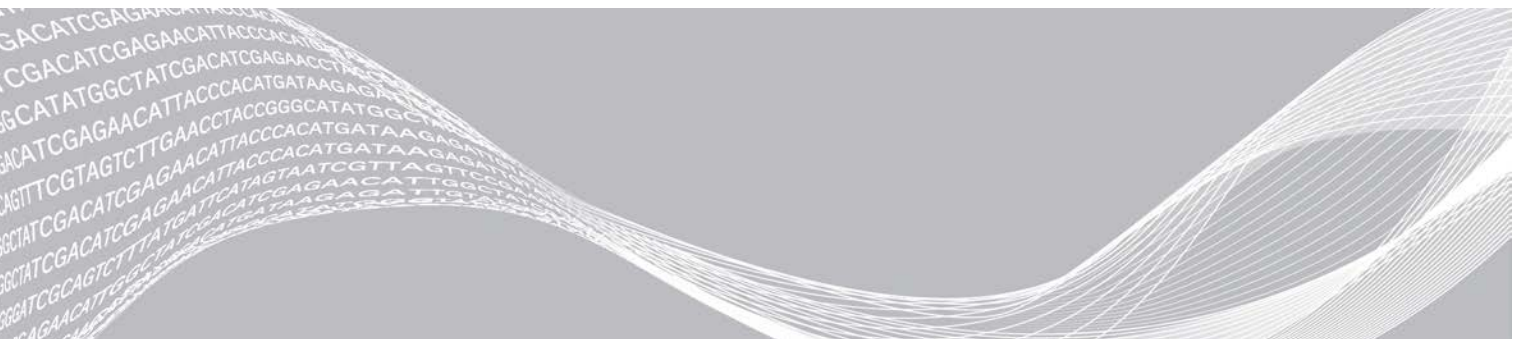


VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben)

Benutzerhandbuch



Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichen Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN, WAS ZU EINEM ERLÖSCHEN DER PRODUKTGARANTIE FÜHRT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Versionshistorie

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000012693 v05	April 2020	Adresse der autorisierten europäischen Vertretung aktualisiert.
Dokument-Nr. 1000000012693 v04	Juli 2018	Einschränkungen des Verfahrens und Anhang B, Methodenvergleichsstudie hinzugefügt.
Dokument-Nr. 1000000012693 v03	Januar 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Schätzung der fetalen Fraktion – weitere Erklärungen hinsichtlich der Schätzung der fetalen Fraktion hinzugefügt. • Tabelle 4 Normale Statusänderungsbenachrichtigungen und Aktionsanforderungen – Hinweis zum Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung für ungültige Proben-IDs im Probenblatt hinzugefügt. • Anweisungen zum Probenblatt und Validierungsregeln – Inhalt des zweiten Hinweises ersetzt. • Tabelle 8 NGS-Option-1-Probenblatt – Validierungsregeln (Datenabschnitt) – Text „Die Proben-ID darf keine Leerzeichen enthalten. Vermeiden Sie mehrere nacheinanderfolgende Unterstriche und Gedankenstriche. Ab Version 1.4 darf die Proben-ID nicht mit einer Null (0) beginnen.“ zu den Validierungsregeln in der Zeile Proben-ID hinzugefügt. • Tabelle 11 NGS-Option-2-Probenblatt – Validierungsregeln (Datenabschnitt) – Text „Die Proben-ID darf keine Leerzeichen enthalten. Vermeiden Sie mehrere nacheinanderfolgende Unterstriche und Gedankenstriche. Ab Version 1.4 darf die Proben-ID nicht mit einer Null (0) beginnen.“ zu den Validierungsregeln in der Zeile Proben-ID hinzugefügt.
Dokument-Nr. 1000000012693 v02	August 2016	Inhalt für v1.4-Version aktualisiert
Dokument-Nr. 1000000012693 v01	Juni 2016	Aktualisiert: <ul style="list-style-type: none"> • Adressen der autorisierten Vertreter in Europa und CE IVD-Kennzeichnung auf der Rückseite • Systemüberblick • Validierungsregeln für die Proben-ID • Erneutes Einstellen der Analyse in die Warteschlange zwecks Erläuterung und um Informationen zur Fehlerbehebung zur Verfügung zu stellen
Dokument-Nr. 1000000012693 v00	April 2016	Erste Version

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Überblick	1
Systemüberblick	1
VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) Konzepte	3
Kapitel 2 Bedienung des Systems	5
Anmelden	5
Organisieren von Daten	5
Kompatibilität von Sequenzierungsläufen	6
Zeitüberschreitungs- und Speicherungsanforderungen für den Workflow	7
Systemdatenfluss	7
Herunterfahren des Systems	23
Kapitel 3 Analyse und Berichterstellung	24
Anweisungen zum Probenblatt und Validierungsregeln	24
Demultiplexierung und FASTQ-Generierung	35
Analyse erneut in die Warteschlange stellen	36
Archivierung und Sicherung von Daten	38
Berichtsspezifikationen und Interpretieren von Kennzahlen	39
Verifizieren, dass ATMS ausgeführt wird	42
Anhang A Kennzahlen der Qualitätssicherung	43
Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 1)	44
Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 2)	51
Anhang B Methodenvergleichsstudie	58
Methodenvergleichsdaten	58
Technische Unterstützung	59

Überblick

Systemüberblick	1
VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) Konzepte	3

Systemüberblick

Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) wird zusammen mit dem VeriSeq NIPT Analysis Server (16 Proben), Illumina-Katalognummer RH-400-1001, angeboten und ist bereits vorinstalliert. Der Server und die vorinstallierte Software bieten Folgendes:

- ▶ Einen Analyseserver mit einer ausreichenden Kapazität, um Sequenzierungsdaten von bis zu zwei Sequenzierungsgeräten der nächsten Generation (NGS) zu analysieren. Die zwei NGS-Geräteoptionen sind:
 - ▶ Ein Sequenzierer mit zwei Fließzellen, der 2-Lane-Fließzellen verwendet (NGS-Option 1).
 - ▶ Ein Sequenzierer mit einer Fließzelle, der eine Fließzelle mit vier Lanes verwendet (NGS-Option 2).
- ▶ Eine Software-Suite, die BCL-formatierte Sequenzierungsdaten analysieren kann, die von der Sequenzierungssoftware aus vorbereiteten Bibliotheken gemäß den cfDNA-Sequenzierungsprotokollen generiert wurden, um basierend auf der Chromosomendarstellung fetale Aneuploidien zu erkennen. Die Software-Suite enthält zwei Komponenten:
 - ▶ **Analysis Task Manager Service (ATMS):** Ein Hintergrunddienst (Daemon), der Folgendes durchführt:
 - ▶ Überwachen von Ausgabepfaden für neue Laufordner.
 - ▶ Analysieren von Metadaten bezüglich der Läufe, um die Konfiguration der Sequenzierungslaufparameter mit einem Satz vorkonfigurierter analytischer Workflows zu vergleichen.
 - ▶ Laden des jeweiligen Probenblatts für jeden Sequenzierungslauf, bei dem die Identitäten der einzelnen Proben einer bestimmten Fließzelle den Indizes zugeordnet sind.
 - ▶ Vorbereiten der Eingaben für das Analyseverfahren.
 - ▶ Ausführen des Analyseverfahrens.
 - ▶ Verfolgen aller Ein- und Ausgabedaten in einer Datenbank.
 - ▶ Generieren eines Laufberichts für jede Probe einer Fließzelle.
 - ▶ **cADAS:** Ein analytisches Verfahren für die Erkennung von fetaler Aneuploidie aus Sequenzierungsdaten, die aus von mütterlichem Plasma isolierter cfDNA generiert wurden.
 - ▶ Analysieren von Sequenzierungsdaten durch Alignment, Abdeckungsberechnung, Datennormalisierung und Zusammenfassungen pro Chromosom.
 - ▶ Generieren von Kennzahlen der Qualitätssicherung und des Status „pass“ (erfolgreich), „fail“ (fehlgeschlagen) oder „warning“ (Warnung) für jede Probe.
 - ▶ Generieren eines Scores, der über- oder unterrepräsentiertes Chromosomenmaterial für jedes der Zielchromosomen bewertet.



HINWEIS

Die maximal zulässige Anzahl an fehlgeschlagenen Proben in einem einzelnen Stapel beträgt 4. Bei Stapeln mit weniger als 11 gültigen Proben sollte keine Analyse durchgeführt werden.

Verwendungszweck

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) generiert quantitative Werte zur Unterstützung der Erkennung und Differenzierung des fetalen Aneuploidie-Status der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y. Hierzu werden Sequenzierungsdaten von zellfreien DNA-Fragmenten (cfDNA) analysiert, die aus mütterlichen peripheren Vollblutproben von Schwangeren isoliert wurden, die sich mindestens in der 10. Schwangerschaftswoche befanden.

Die quantitativen Werte sind z-Werte, die mit einer Unter- oder Überrepräsentanz eines Zielchromosoms bezüglich eines erwarteten diploiden Genoms im Zusammenhang stehen.

Einschränkungen des Verfahrens

- ▶ Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) ist für den Einsatz im Rahmen eines Screeningtests vorgesehen, der nicht unabhängig von anderen klinischen Ergebnissen und Testergebnissen betrachtet werden sollte. Bei benutzerdefinierten Cutoffs für die Datenausgabe dieser Software sollte berücksichtigt werden, dass eine Erhöhung der Empfindlichkeit gewisse Vorteile bietet, aber zu Lasten der Spezifität geht. Gleiches gilt umgekehrt. Bei keinem einzigen Cutoff lässt sich gleichzeitig eine Empfindlichkeit von 100 % UND eine Spezifität von 100 % erzielen. In seltenen Fällen können Proben mit einem für die Sequenzierungstiefe relativ niedrigen FF Datenausgaben nahe dem Schwellenwert sowie eine geringere Genauigkeit aufweisen.
- ▶ Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) gibt Daten für die Berichterstellung in folgenden Fällen aus:
 - ▶ Überrepräsentanz der Chromosomen 21, 18 und 13
 - ▶ Die folgenden Geschlechtschromosomen-Aneuploidien: XO, XXX, XXY und XYY
- ▶ Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) ist nicht für die Berichterstellung bei Polyploidie vorgesehen.
- ▶ Die in der VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) verwendeten Algorithmen können durch bestimmte maternale und fetale Faktoren verfälscht werden, z. B. folgende:
 - ▶ Mutter hat vor Kurzem eine Bluttransfusion erhalten
 - ▶ Organtransplantation bei der Mutter
 - ▶ Chirurgischer Eingriff bei der Mutter
 - ▶ Mutter hat Immuntherapie oder Stammzellentherapie erhalten
 - ▶ Mutter leidet an maligner Erkrankung
 - ▶ Mosaizismus der Mutter
 - ▶ Begrenzter plazentaler Mosaizismus
 - ▶ Tod des Fetus
 - ▶ Verstorbener Zwillings-Fetus
 - ▶ Partielle Trisomie oder partielle Monosomie des Fetus
 - ▶ Fötaler Mosaizismus

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) Konzepte

Die folgenden Konzepte und Begriffe gelten für die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben).

Konzept	Beschreibung
cADAS	Die Analyseverfahrenssoftware. Eine serverseitige Anwendung für die Analyse von Sequenzierungsdaten und die Erkennung von Aneuploidien.
cfDNA	Zellfreie DNA ist DNA sowohl mütterlichen als auch fetalen Ursprungs, die im mütterlichen Blutkreislauf frei zirkuliert. Die Analyse von cfDNA ist ein Verfahren für nicht-invasive Pränataltests.
Laufordner	Die vom NGS-Sequenzierungsgerät generierte und von der primären RTA-Datenanalyse gefüllte Ordnerstruktur.
Probenblatt	Eine kommagetrennte Wertedatei (*.csv), die die zum Konfigurieren und Analysieren eines Sequenzierungslaufs erforderlichen Informationen enthält, darunter eine Liste von Proben und deren Indexsequenzen.
Workflow	Ein analytisches Verfahren für die Analyse von Sequenzierungsläufen, die von der VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) durchgeführt werden. Der Workflow für jeden Lauf wird im Probenblatt angegeben.

Softwareanalyse – Überblick

Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) untersucht die Kopienzahl der Testchromosomen in Versuchspröben. Die Analyseingabe umfasst 36-Basen-Reads, die von einem Sequenzierungsgerät der nächsten Generation generiert wurden. Reads werden mit dem gesamten Humangenom aligniert. Zur weiteren Analyse werden nur Reads verwendet, die gegen eine eindeutige Position oder Stelle im Genom aligniert sind. Doppelte Reads werden aus der Analyse entfernt. Die Reads werden weiter gefiltert, um Stellen auszuschließen, die hohe Abdeckungsvariationen über euploide Proben hinweg aufweisen. Die Rohabdeckung wird für GC-Inhalte und andere Faktoren auf subchromosomaler Ebene durch Normalisierung angepasst und anschließend durch den zuverlässigen Mittelwert der Abdeckung entlang des Chromosoms in der chromosomalen Abdeckung zusammengefasst.

Die Testchromosomen umfassen 21, 18 und 13, X und Y. Die normalisierte Abdeckung bei Testchromosomen wird auf die vordefinierten Referenz-(Denominator-)Chromosomen normalisiert, um das Test-Chromosomenverhältnis (R) zu erzeugen. Die vordefinierten Denominator-Chromosomen werden optimiert, um die Varianz in den Chromosomenverhältnissen für euploide Proben maximal zu reduzieren. Die Chromosomenverhältnisse für Testproben werden mithilfe einer Korrektur des Fließzellen-angepassten Verhältnismittelwerts und durch Skalierung nach vordefinierter erwarteter Variation in normalen euploiden Proben (aus den Trainingsdaten geschätzt) in normalisierte Chromosomenwerte (NCVs) umgewandelt.

Abbildung 1 Test-Chromosomenverhältnis (R) – Beispiel

$$R = \frac{\text{X}^{21}}{\text{X}^4 + \text{X}^7 + \text{X}^{15} \dots}$$

Der normalisierte Chromosomenwert (NCV) wird mithilfe der in [Abbildung 2](#) dargestellten Gleichung berechnet. Der NCV-Wert entspricht einem z-Wert. Ein z-Wert beschreibt die Differenz zwischen einem Wert und dem Bevölkerungsmittelwert in Bezug auf die Standardabweichung. Der Schwellenwert, der basierend auf dem NCV-Wert eine Probe als betroffen oder nicht betroffen definiert, wird von Kunden vor ihrer klinischen Validierung des Workflows bestimmt und kann basierend auf den Ergebnissen der klinischen Validierungsstudie angepasst werden.

Abbildung 2 Normalisierter Chromosomenwert (NCV)

$$NCV_{ik} = \frac{R_{ik} - \overline{R_{Ui}}}{\sigma_{Ui}}$$

i – Chromosom

k – Probe

U – Nicht betroffene Probe

R_{ik} – Verhältnis des Chromosoms i in der k . Probe

$\overline{R_{Ui}}$ – Fließzellen-angepasstes mittleres Chromosomenverhältnis

σ_{Ui} – Standardabweichung für das Verhältnis von Chromosom i in den nicht betroffenen Proben aus dem Training-Datensatz

Schätzung der fetalen Fraktion

Die fetale Fraktion ist der Prozentsatz der zellfreien zirkulierenden DNA in einer Probe mütterlichen Bluts, die aus der Plazenta gewonnen wird. VeriSeq NIPT Analysis Software berechnet den Schätzwert der fetalen Fraktion auf der Basis von Unterschieden in der genomischen Abdeckung zwischen mütterlicher und fetaler cfDNA.¹

Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) verwendet bei der Sequenzierung generierte Statistikwerte, um für jede Probe die geschätzte fetale Fraktion (Fetal Fraction Estimation, FFE) anzugeben. Die FFE ist der geschätzte Bestandteil fetaler cfDNA, der vom Assay zurückgewonnen wurde. Sie wird für jede Probe als gerundeter Prozentsatz ausgewiesen. Die durchschnittliche Standardabweichung dieser Schätzung in allen Proben beträgt 2 %. Die FFE wird nicht verwendet, um Proben bei der Berichterstellung auszuschließen.

¹Kim, S.K., et al, Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts, Prenatal Diagnosis Aug 2015; 35(8):810–5. doi: 10.1002/pd.4615

Bedienung des Systems

Anmelden	5
Organisieren von Daten	5
Kompatibilität von Sequenzierungsläufen	6
Zeitüberschreitung- und Speicherungsanforderungen für den Workflow	7
Systemdatenfluss	7
Herunterfahren des Systems	23

Anmelden

Der Analyseserver ist als Linux CentOS 6.6-Gerät mit einem sbsuser-Konto konfiguriert.

Die Anmeldung beim Server ist nicht Teil des normalen Betriebs. Sie ist lediglich für das Initiieren eines Neustarts oder das Herunterfahren des Servers erforderlich.

Melden Sie sich beim Server über ein Terminal oder mithilfe einer SSH-Verbindung mit den ursprünglich voreingestellten Anmeldeinformationen an:

- ▶ **User Name** (Benutzername): sbsuser
- ▶ **Password** (Kennwort): Senden Sie eine E-Mail an den technischen Support von Illumina, um das Kennwort zu erhalten.
- ▶ **Group** (Gruppe): sbsuser

Organisieren von Daten

Der Analyseserver verfügt über eine Netzwerkfreigabedienstkombination, die von Windows-Systemen aus den Zugriff auf die Festplatte über das Samba-Protokoll ermöglicht. Der voreingestellte Benutzername und das anfängliche Kennwort für die Samba-Freigaben lauten „sbsuser“ und „sbs123“. Das Disk-Sharing für dieses Benutzerkonto über das Samba-Protokoll ermöglicht den Zugriff auf die folgende Freigabe:

Speicherort auf dem Linux-Server	Name der Freigabe	Benutzername	Anfängliches Kennwort	Zugriffsrechte
/data01/runs	runs	sbsuser	Senden Sie eine E-Mail an den technischen Support von Illumina, um das Kennwort zu erhalten.	Lesen/Schreiben
/data01/analysis_output	analysis_output	sbsuser	Senden Sie eine E-Mail an den technischen Support von Illumina, um das Kennwort zu erhalten.	Lesen

Legen Sie bei der Konfiguration des Sequenzierungslaufs das Verzeichnis runs als Ausgabeordner fest. Navigieren Sie über die Laufkonfigurationsbildschirme der Steuerungssoftware für das Sequenzierungsgerät zum Verzeichnis \\<SERVER.IP.ADDRESS>\runs, wobei <SERVER.IP.ADDRESS> die IP-Adresse des Onsite-Servers ist.

Das Verzeichnis „analysis_output“ enthält Berichte für alle vom analytischen cfDNA-Workflow verarbeiteten Fließzellen. Das System organisiert Berichte nach dem ursprünglichen, von der Sequenzierungssoftware generierten Laufordnernamen und fügt ihnen das Datum und die Uhrzeit der Analyse hinzu.

Die Analyse des Laufs „140806_SN7001227_0199_AHABHTADXX“ generiert z. B. einen Ausgabeordner namens „140806_SN7001227_0199_AHABHTADXX_140806_230337“.

Verwenden Sie das von Ihrem Sequenziersystem bereitgestellte Standard-Namensformat für Laufordner. Die VeriSeq NIPT Analysis Software erfordert, dass der Name des Laufordners nur die folgenden alphanumerischen Zeichen enthalten darf: a–z, A–Z, 0–9 und Unterstrich („_“). Leerzeichen und andere Zeichen sind nicht zulässig.

Kompatibilität von Sequenzierungsläufen

Der Server analysiert nur Sequenzierungsläufe, die mit dem analytischen cfDNA-Workflow kompatibel sind. Konfigurieren Sie die Sequenzierung mithilfe kompatibler Read-Parameter.

Für NGS-Option 1:

- ▶ **Read 1:** 36 Basen
- ▶ **Index 1 (i7):** 7 Basen

Für NGS-Option 2:

- ▶ **Read 1:** 36 Basen
- ▶ **Index 1 (i7):** 6 Basen

Verwenden Sie nur kompatible Sequenzierungsmethoden und Softwareversionen, um Base-Calls zu generieren.



HINWEIS

Überwachen Sie regelmäßig die Leistungskennzahlen der Sequenzierungsdaten, um sicherzugehen, dass die Datenqualität den Spezifikationen entspricht.

Tabelle 1 NGS-Option 1 – Kompatible Sequenzierungsmethoden und Softwareversionen

Parameter	Kompatibler Wert
SBS	TruSeq Rapid SBS-Kit TruSeq Rapid SBS-Kit v1 oder HiSeq Rapid SBS-Kit v2
Index	TruSeq Rapid SR Cluster-Kit TruSeq Rapid SR-Cluster-Kit v1 oder HiSeq Rapid SR-Cluster-Kit v2
Clustering-Wahl	OnBoardClustering
Name der Anwendung	HiSeq Control Software
Version der Anwendung	2.0.12 oder 2.2.38 oder 2.2.58
FPGA-Version	3.10.3 oder 7.7.2.5 oder 7.9.7
RTA-Version	1.17.21 oder 1.18.61 oder 1.18.64

Tabelle 2 NGS-Option 2 – Kompatible Sequenzierungsmethoden und Softwareversionen

Parameter	Kompatibler Wert
Name der Anwendung	NextSeq Control Software
Version der Anwendung	1.3.0 oder 2.0.0 oder 2.1.0
RTA-Version	2.1.3 oder 2.4.6 oder 2.4.11

Zeitüberschreitungs- und Speicherungsanforderungen für den Workflow

Der analytische cfDNA-Workflow unterliegt den folgenden Zeitüberschreitungs- und Speicherungseinschränkungen.

Tabelle 3 Zeitüberschreitungs- und Speicherungsanforderungen für den Workflow

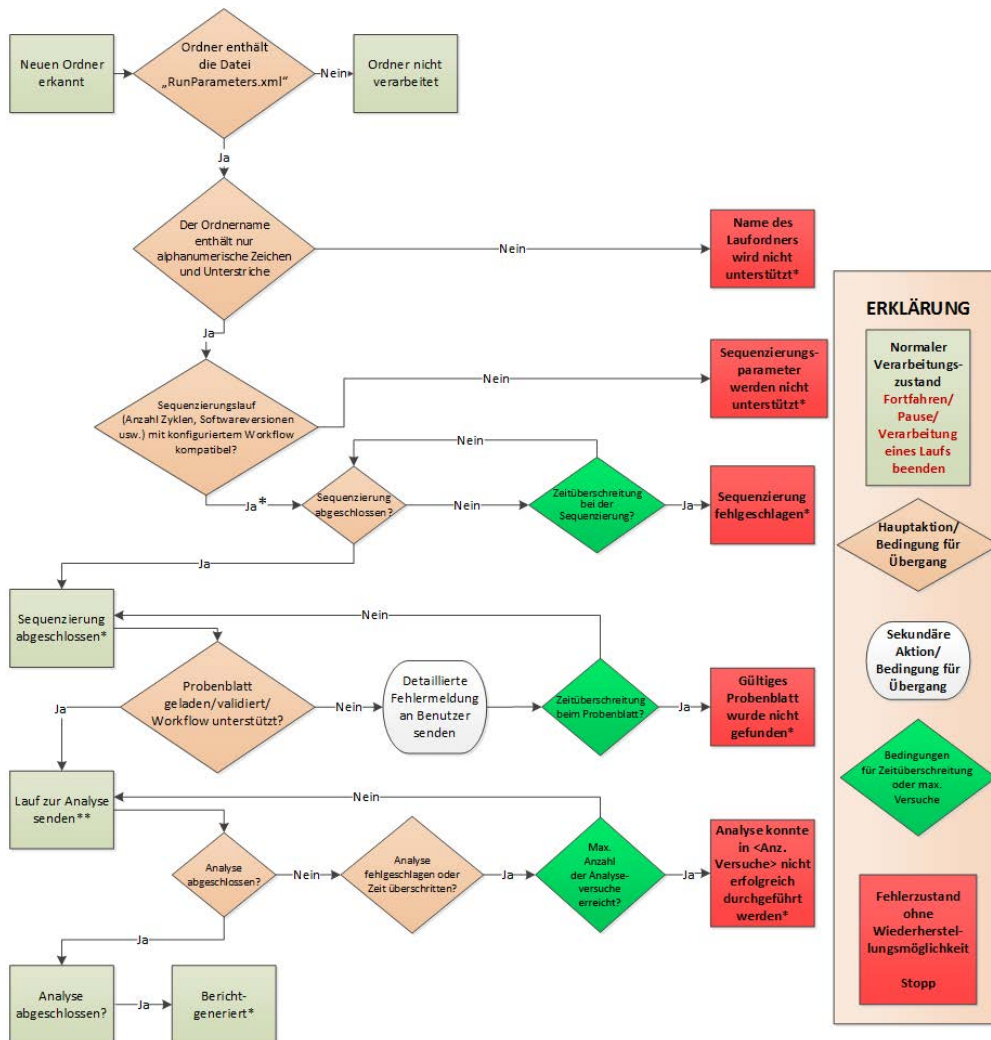
Parameter	Standardwert
Maximale Laufparameter-Wartezeit	4 Stunden
Maximale Sequenzierungsdauer	20 Stunden
Maximale Probenblatt-Wartezeit	96 Stunden
Maximale Dauer der Analyse	3,5 Stunden
Minimaler temporärer Speicherplatz	200 GB

Systemdatenfluss

Unter normalen Bedingungen sendet ATMS Sequenzierungslauf- und Analysestatus-Benachrichtigungen per E-Mail an Benutzer. [Abbildung 3](#) zeigt den Datenfluss durch das System und die Zustände zusammen mit den entsprechenden E-Mail-Benachrichtigungen.

- ▶ **Graue Rechtecke:** Normale Verarbeitungszustände
- ▶ **Rauten:** Primäre Voraussetzungen für den Übergang zum nächsten Zustand
- ▶ **Ovale:** Sekundäre Voraussetzungen für den Übergang zum nächsten Zustand
- ▶ **Rote Rechtecke:** Fehlerstatus

Abbildung 3 Datenflussdiagramm



ERKLÄRUNG

- Normaler Verarbeitungszustand Fortfahren/ Pause/ Verarbeitung eines Laufs beenden
- Hauptaktion/ Bedingung für Übergang
- Sekundäre Aktion/ Bedingung für Übergang
- Bedingungen für Zeitüberschreitung oder max. Versuche
- Fehlerzustand ohne Wiederherstellungsmöglichkeit
- Stopp

* Die E-Mail-Benachrichtigung wird vom System generiert.

** Das System sendet eine entsprechende E-Mail-Benachrichtigung, wenn nicht ausreichend Speicherplatz auf dem Server zur Verfügung steht.

Bei der normalen Verarbeitung führt der ATMS Folgendes durch:

- ▶ Überprüft das Standardverzeichnis (/data01/runs) auf neue Sequenzierungsläufe. Neue Sequenzierungsläufe sind Ordner, die die Datei runParameters.xml [NGS-Option 1] bzw. RunParameters.xml [NGS-Option 2] enthalten.
- ▶ Verifiziert die Kompatibilität der Sequenzierungslaufparameter mit vordefinierten Analyse-Workflows.
- ▶ Lädt das Probenblatt.
- ▶ Plant und führt die analytische Verarbeitung aus, um die endgültigen Berichte zu generieren.

Die Fließzellen werden einzeln analysiert. Weitere Fließzellen, die auf die Analyse warten, werden auf dem Server in die Warteschlange eingereiht und anschließend in der Reihenfolge analysiert, in der sie geladen wurden.

Systembenachrichtigungen

Das System sendet E-Mail-Benachrichtigungen an Personen oder an E-Mail-Verteiler, die beim Installieren des Servers eingerichtet wurden. Illumina empfiehlt die Verwendung von E-Mail-Verteilern, die der E-Mail-Administrator bearbeiten kann. Bei einer Konfiguration mit einzelnen Adressen muss die E-Mail-Konfiguration des Analyseservers jedes Mal geändert werden, wenn es Änderungen bei den Benutzern gibt. Die E-Mail-Benachrichtigungen geben den Status während des normalen Betriebs an und machen den Benutzer auf etwaige Fehler aufmerksam, die bei der Analyse auftreten.

In [Tabelle 4](#) werden die verschiedenen vom System gesendeten E-Mail-Benachrichtigungen beschrieben. Die Namenskonventionen in der Tabelle werden von der VeriSeq NIPT Analysis Software benötigt, um die NGS-Ausgabedateien importieren zu können.



HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass die Spam-Einstellungen E-Mail-Benachrichtigungen vom Server zulassen. E-Mail-Benachrichtigungen werden von einem Konto namens `atms@<E-Mail-Domäne des Kunden>` gesendet, wobei die `<E-Mail-Domäne des Kunden>` von Ihrem lokalen IT-Team bei der Installation des Servers angegeben wird.

Tabelle 4 Normale Statusänderungenbenachrichtigungen und Aktionsanforderungen

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
<p>Sequenzierung gestartet. Diese Benachrichtigung wird gesendet, wenn der Server einen neuen Laufordner erkennt. Der Laufordner enthält die Laufparameterdatei, d. h. die Sequenzierung mit den entsprechenden Sequenzierungsparametern wurde gestartet. Name der Laufparameterdatei: [NGS-Option 1] runParameters.xml [NGS-Option 2] RunParameters.xml</p>	Normaler Betrieb	<p>Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners:) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX Sequencing Run Status: Sequencing started (Status des Sequenzierungslaufs: Sequenzierung gestartet) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung:) 2014-05-12 08:15 PDT Sequencing Complete Time: NA (Ende der Sequenzierung: n. z.) Workflow Name: NA (Workflow-Name: n. z.) Analysis Scheduled Time: NA (Geplante Zeit für die Analyse: n. z.) Analysis Start Time: NA (Beginn der Analyse: n. z.) Analysis Finish Time: NA (Ende der Analyse: n. z.) Analysis Output Directory: NA (Analyse-Ausgabeverzeichnis: n. z.)</p>
<p>Sequenzierungslauf abgeschlossen.</p>	Normaler Betrieb	<p>Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners:) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX Sequencing Run Status: Sequencing completed (Status des Sequenzierungslaufs: Sequenzierung abgeschlossen) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung:) 2014-05-12 08:15 PDT Sequencing Complete Time: (Ende der Sequenzierung:) 2014-05-12 08:16 PDT Workflow Name: NA (Workflow-Name: n. z.) Analysis Scheduled Time: NA (Geplante Zeit für die Analyse: n. z.) Analysis Start Time: NA (Beginn der Analyse: n. z.) Analysis Finish Time: NA (Ende der Analyse: n. z.) Analysis Output Directory: NA (Analyse-Ausgabeverzeichnis: n. z.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Sequenzierungslaufparameter werden nicht unterstützt.	Fehler (nicht wiederherstellbar)	<p>Sequencing run parameters for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' are not supported by any of the configured workflows. (Die Sequenzierungslaufparameter für den Sequenzierungslauf „140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“ werden von den konfigurierten Workflows nicht unterstützt.)</p> <p>This sequencing run folder will not be processed further. (Dieser Sequenzierungslaufordner wird nicht weiter verarbeitet.) See the following errors: (Siehe folgende Fehler:)</p> <p>Workflow Name (Workflow-Name): [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0</p> <p>Mismatching Sequence Run Parameters found: (Nicht übereinstimmende Sequenzierungslaufparameter gefunden:) NumCycles2, NumIndexed2 Found NumCycles2 value: 10, expected value: 7 (Gefundener NumCycles2-Wert: 10, erwarteter Wert: 7) Found NumIndexed2 value: 10, expected value: 7 (Gefundener NumIndexed2-Wert: 10, erwarteter Wert: 7)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Falscher Fließzellen-Barcode auf dem Probenblatt erkannt.	Warnung (wiederherstellbar innerhalb von 96 Stunden)	<p>The sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' found in the sequencing run folder generated the following error: (Das im Sequenzierungslauf gefundene Probenblatt für den Sequenzierungslauf „140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“ erzeugte den folgenden Fehler:)</p> <p>The flow cell ID (barcode) recorded in the sample sheet ('Experiment Name' slot) is ''. (Die auf dem Probenblatt [„Versuchsname“] aufgezeichnete Fließzellen-ID [Barcode] lautet ''.)</p> <p>This barcode is required to be identical to the barcode associated with the run folder 'H8HT6ADXX'. (Dieser Barcode muss mit dem Barcode identisch sein, der dem Laufordner „H8HT6ADXX“ zugeordnet ist.)</p> <p>Please correct the error in order to proceed with analysis. (Bitte beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.)</p> <p>The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Das Probenblatt wird in ca. einer Minute erneut hochgeladen.)</p> <p>The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Das Probenblatt befindet sich im Laufordner „/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Nicht unterstützter Workflow in der Kopfzeile „Description“ (Beschreibung) des Probenblatts erkannt.	Warnung (wiederherstellbar innerhalb von 96 Stunden)	<p>The sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' found in the sequencing run folder generated the following error: (Das im Sequenzierungslauf gefundene Probenblatt für den Sequenzierungslauf „140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“ erzeugte den folgenden Fehler:)</p> <p>The workflow indicated in the sample sheet 'NIPT template1' is not supported by any of the configured workflows. (Der auf dem Probenblatt „NIPT template1“ angegebene Workflow wird von keinem der konfigurierten Workflows unterstützt.)</p> <p>The supported workflow names are: (Die Namen der unterstützten Workflows lauten:)</p> <p>[NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0</p> <p>Please correct the error in order to proceed with analysis. (Bitte beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.)</p> <p>The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Das Probenblatt wird in ca. einer Minute erneut hochgeladen.)</p> <p>The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Das Probenblatt befindet sich im Laufordner „/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Die Datei „SampleSheet.csv“ ist im Sequenzierungslaufordner nicht vorhanden.	Warnung (wiederherstellbar innerhalb von 96 Stunden)	<p>The sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' in the sequencing run folder generated the following error: (Das im Sequenzierungslaufordner gefundene Probenblatt für Sequenzierungslauf „140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“ erzeugte den folgenden Fehler:)</p> <pre>./data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX/SampleSheet.csv (No such file or directory)'. (Datei oder Verzeichnis existiert nicht.)</pre> <p>Please correct the error in order to proceed with analysis. (Bitte beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.)</p> <p>The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Das Probenblatt wird in ca. einer Minute erneut hochgeladen.)</p> <p>The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Das Probenblatt befindet sich im Laufordner „./data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Ungültige Proben-IDs im Probenblatt.	Fehler (kann durch Korrektur der Proben-IDs behoben werden)	<p>Parsing the sample sheet for sequencing run '160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX' in the sequencing run folder generated the following error(s): (Die Analyse des Probenblatts für Sequenzierungslauf „160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX“ im Sequenzierungslaufordner erzeugte folgende(n) Fehler:) Error: Invalid Sample IDs found (contain characters other than alpha-numeric / dashes / underscores). (Fehler: Ungültige Proben-IDs gefunden (enthalten andere Zeichen als alphanumerische Zeichen/Schrägstriche/Unterstriche).) Invalid Sample ID values are: Plasma Control. (Ungültige Proben-ID-Werte sind: Plasma Control (Plasmakontrollprobe).) Correct the error to proceed with analysis. (Beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1.0 minutes. (Das Probenblatt wird in ca. 1,0 Minuten erneut hochgeladen.) Sample sheet should be located in the run folder '/data01/runs/160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX'. (Das Probenblatt sollte sich im Laufordner „/data01/runs/160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX“ befinden.) Note: This error is generated if any invalid characters, including spaces, are included in the sample sheet. (Hinweis: Dieser Fehler wird generiert, wenn das Probenblatt ungültige Zeichen, einschließlich Leerzeichen, enthält.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Fehlende Kopfzeile auf dem Probenblatt.	Warnung (wiederherstellbar innerhalb von 96 Stunden)	<p>Attempt to load sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' generated the following error: (Beim Versuch, das Probenblatt für den Sequenzierungslauf „140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“ zu laden, ist ein Fehler aufgetreten.) Error: Invalid Sample Sheet Header. (Fehler: Ungültige Probenblattkopfzeile.) Missing required fields: Description (Fehlende erforderliche Felder: Description) Please correct the error in order to proceed with analysis. (Bitte beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Das Probenblatt wird in ca. einer Minute erneut hochgeladen.) The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Das Probenblatt befindet sich im Laufordner „/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX“.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Doppelte Indexwerte im Probenblatt.	Fehler (kann durch Korrektur des Probenblatts behoben werden)	<p>Parsing the sample sheet for sequencing run '140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2' in the sequencing run folder generated the following error(s): (Die Analyse des Probenblatts für den Sequenzierungslauf „140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2“ im Sequenzierungslaufordner erzeugte folgende(n) Fehler:)</p> <p>Error: Duplicate Index value found: ACTGAT (A025) for Lane: 1 (Fehler: Doppelter Indexwert gefunden: ACTGAT (A025) für Lane: 1)</p> <p>Invalid sample record found: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 for Index: ACTGAT (Ungültiger Probandensatz gefunden: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 für Index: ACTGAT)</p> <p>Duplicate Index value found: ATTCCT (A027) for Lane: 1 (Doppelter Indexwert gefunden: ATTCCT (A027) für Lane: 1)</p> <p>Invalid sample record found: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 for Index: ATTCCT (Ungültiger Probandensatz gefunden: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 für Index: ATTCCT)</p> <p>Duplicate Index value found: ACTGAT (A025) for Lane: 2 (Doppelter Indexwert gefunden: ACTGAT (A025) für Lane: 2)</p> <p>Invalid sample record found: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 for Index: ACTGAT (Ungültiger Probandensatz gefunden: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 für Index: ACTGAT)</p> <p>Duplicate Index value found: ATTCCT (A027) for Lane: 2 (Doppelter Indexwert gefunden: ATTCCT (A027) für Lane: 1)</p> <p>Invalid sample record found: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 for Index: ATTCCT (Ungültiger Probandensatz gefunden: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 für Index: ATTCCT)</p> <p>Correct the error to proceed with analysis. (Beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1.0 minutes. (Das Probenblatt wird in ca. 1,0 Minuten erneut hochgeladen.)</p> <p>Sample sheet should be located in the run folder '/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2'. (Das Probenblatt sollte sich im Laufordner „/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2“ befinden.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
Fehlender oder ungültiger Lane-Wert (nur NGS-Option 1).	Fehler (kann durch Korrektur der Proben-IDs behoben werden)	<p>Parsing the sample sheet for sequencing run '140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY' in the sequencing run folder generated the following error(s): (Die Analyse des Probenblatts für den Sequenzierungslauf „140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY“ im Sequenzierungslaufordner erzeugte folgende(n) Fehler:)</p> <p>Error: Invalid Lane value found at row: 47. (Fehler: Ungültigen Lane-Wert in folgender Zeile gefunden: 47.)</p> <p>Invalid value: Invalid Lane value found at row: 47. (Ungültiger Wert: Ungültigen Lane-Wert in folgender Zeile gefunden: 47.)</p> <p>Invalid value: Invalid Sample IDs found (contain characters other than alpha-numeric / dashes / underscores). (Ungültiger Wert: Ungültige Proben-IDs gefunden [enthalten andere Zeichen als alphanumerische Zeichen/Schrägstriche/Unterstriche].)</p> <p>Invalid Sample ID values are: <blank> (Ungültige Proben-ID-Werte sind: <leer>)</p> <p>Correct the error to proceed with analysis. (Beheben Sie den Fehler, um mit der Analyse fortzufahren.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1.0 minutes. (Das Probenblatt wird in ca. 1,0 Minuten erneut hochgeladen.)</p> <p>Sample sheet should be located in the run folder '/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY'. (Das Probenblatt sollte sich im Laufordner „/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY“ befinden.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
<p>Sequenzierungslauf fehlgeschlagen. Keine RTA Complete-Datei. Diese Benachrichtigung wird gesendet, wenn die RTA Complete-Datei nach 20 Stunden nicht gefunden wurde.</p>	<p>Fehler (nicht wiederherstellbar: Datei „RTAComplete.txt“ nach der maximalen Wartezeit von 20 Stunden)</p>	<p>Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners;) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_D12_NO_RTAComplete_TC_SC_3 Sequencing Run Status: Failed sequencing (Status des Sequenzierungslaufs: Sequenzierung fehlgeschlagen) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung;) 2014-05-12 19:45 PDT Sequencing Complete Time: NA (Ende der Sequenzierung: n. z.) Workflow Name: NA (Workflow-Name: n. z.) Analysis Scheduled Time: NA (Geplante Zeit für die Analyse: n. z.) Analysis Start Time: NA (Beginn der Analyse: n. z.) Analysis Finish Time: NA (Ende der Analyse: n. z.) Analysis Output Directory: NA (Analyse-Ausgabeverzeichnis: n. z.)</p>
<p>Analyse gestartet. Diese Benachrichtigung wird gesendet, wenn die Analyse beginnt. Sie erscheint nach der Anzeige von RTA Complete, wodurch die Analyse ausgelöst wird. Die Analyse dauert eine bis zwei Stunden.</p>	<p>Normaler Betrieb</p>	<p>Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners;) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX Sequencing Run Status: Analysis started (Status des Sequenzierungslaufs: Analyse gestartet) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung;) 2014-05-12 19:45 PDT Sequencing Complete Time: (Ende der Sequenzierung;) 2014-05-12 19:55 PDT Workflow Name (Workflow-Name): [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 Analysis Scheduled Time: (Geplante Zeit für die Analyse;) 2014-05-12 20:05 PDT Analysis Start Time: (Beginn der Analyse;) 2014-05-12 20:06 PDT Analysis Finish Time: NA (Ende der Analyse: n. z.) Analysis Output Directory: NA (Analyse-Ausgabeverzeichnis: n. z.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
<p>Analyse fehlgeschlagen. Das System führt automatisch bis zu drei Mal eine erneute Verarbeitung des Laufs aus.</p>	<p>Warnung (wiederherstellbar durch erneute Ausführung der Analyse – ATMS stellt den Vorgang bis zu drei Mal erneut in die Warteschlange)</p>	<p>Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners:) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX Sequencing Run Status: Analysis failed. (Status des Sequenzierungslaufs: Analyse fehlgeschlagen.) It will automatically be restarted to reprocess the run. (Sie wird automatisch neu gestartet, um den Lauf erneut zu verarbeiten.) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung:) 11.05.2014 08:26 PDT Sequencing Complete Time: (Ende der Sequenzierung:) 11.05.2014 08:27 PDT Workflow Name (Workflow-Name): [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 Analysis Scheduled Time: (Geplante Zeit für die Analyse:) 11.05.2014 08:47 PDT Analysis Start Time: (Beginn der Analyse:) 11.05.2014 08:57 PDT Analysis Finish Time: (Ende der Analyse:) 2014-05-11 08:59 PDT Analysis Output Directory: NA (Analyse-Ausgabeverzeichnis: n. z.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
<p>Die maximale Anzahl der Analyseversuche ist fehlgeschlagen. Diese Benachrichtigung wird nach dem dritten erfolglosen Analyseversuch gesendet.</p>	<p>Fehler (nicht wiederherstellbar)</p>	<p>Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners:) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_TC_A_3 Sequencing Run Status: Maximum number of analysis attempts were exhausted. (Status des Sequenzierungslaufs: Die maximale Anzahl der Analyseversuche ist erreicht.) Please contact Illumina Technical Support. (Bitte wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung:) 13.05.2014 07:00 PDT Sequencing Complete Time: (Ende der Sequenzierung:) 13.05.2014 07:01 PDT Workflow Name (Workflow-Name): [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 Analysis Scheduled Time: (Geplante Zeit für die Analyse:) 13.05.2014 07:09 PDT Analysis Start Time: (Beginn der Analyse:) 13.05.2014 07:11 PDT Analysis Finish Time: (Ende der Analyse:) 13.05.2014 07:12 PDT Analysis Output Directory: NA (Analyse-Ausgabeverzeichnis: n. z.)</p>
<p>Der Name des Laufordners enthält ungültige Zeichen.</p>	<p>Fehler (wiederherstellbar durch Entfernen der ungültigen Zeichen)</p>	<p>Invalid Sequencing Run Folder name found: (Der Name des folgenden Sequenzierungslaufordners ist ungültig:) '140207 D00409 0027 AH8HT6ADXX' The Sequencing Run Folder name can only contain the following alphanumeric characters: a-z, A-Z, 0-9, and underscores ("_"). No spaces or other characters are allowed. (Leerzeichen und andere Zeichen sind nicht zulässig.) This sequencing run folder will not be processed further. (Dieser Sequenzierungslaufordner wird nicht weiter verarbeitet.) Correct the run folder name to requeue for analysis. (Korrigieren Sie den Laufordnernamen, damit der Ordner erneut in die Warteschlange gestellt werden kann.)</p>

Bedingung	Normal/Warnung/Fehler	Beispielinhalt der E-Mail-Benachrichtigung
cfDNA-Sequenzierungsbericht wurde generiert.	Normaler Betrieb	Sequencing Run Folder Name: (Name des Sequenzierungslaufordners:) 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX Sequencing Run Status: Reports generated (Status des Sequenzierungslaufs: Berichte wurden generiert) Sequencing Start Time: (Beginn der Sequenzierung:) 2014-05-12 19:45 PDT Sequencing Complete Time: (Ende der Sequenzierung:) 2014-05-12 19:55 PDT Workflow Name (Workflow-Name): [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 Analysis Scheduled Time: (Geplante Zeit für die Analyse:) 2014-05-12 20:05 PDT Analysis Start Time: (Beginn der Analyse:) 2014-05-12 20:06 PDT Analysis Finish Time: (Ende der Analyse:) 12.05.2014 21:24 PDT Analysis Output Directory: (Analyse-Ausgabeverzeichnis:) /data01/analysis_output/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_140512_200514

Herunterfahren des Systems

Wiederherstellung nach unerwartetem Ausschalten

Im Falle eines Stromausfalls oder unbeabsichtigten Ausschaltens des Systems durch den Benutzer während des Analyselaufs geschieht Folgendes:

- ▶ Die Software wird automatisch neu gestartet, wenn das System neu gestartet wird.
- ▶ Das System erkennt, dass die Analyse, die zum Zeitpunkt des Ausschaltens gelaufen ist, fehlgeschlagen ist und stellt sie erneut in die Warteschlange.
- ▶ Das System generiert die entsprechende Ausgabe, wenn die Analyse erfolgreich durchgeführt wurde.



HINWEIS

Falls die Analyse fehlschlägt, kann das System den Lauf zwecks Analyse bis zu drei Mal erneut in die Verarbeitungswarteschlange stellen.

Analyse und Berichterstellung

Anweisungen zum Probenblatt und Validierungsregeln	24
Demultiplexierung und FASTQ-Generierung	35
Analyse erneut in die Warteschlange stellen	36
Archivierung und Sicherung von Daten	38
Berichtsspezifikationen und Interpretieren von Kennzahlen	39
Verifizieren, dass ATMS ausgeführt wird	42

Anweisungen zum Probenblatt und Validierungsregeln

Dieser Abschnitt enthält Anweisungen für das Erstellen des Probenblatts, das die VeriSeq NIPT Analysis Software für die Analyse eines Laufordners benötigt. Befolgen Sie die Anweisungen für die von Ihnen verwendete NGS-Option.



HINWEIS

Überprüfen Sie, dass die Proben-IDs den entsprechenden Indizes korrekt zugeordnet wurden. Eine genaue Zuordnung ist erforderlich, um die Probenintegrität sicherzustellen. Lassen Sie vor dem Start des Sequenzierungslaufs das Probenblatt durch eine zweite Person überprüfen – jedoch nicht durch die Person, die es erstellt hat. Fehler bei der Zusammenführung mit einer falschen Zuordnung der Proben zu den entsprechenden Indizes können zu potenziell fehlerhaften Ergebnissen für fehlidentifizierte Proben führen.



HINWEIS

Fügen Sie immer eine Prozesskontrolle und eine negative Kontrolle (keine Matrizenkontrolle) zum Probencharge hinzu. Die Prozesskontrolle (jedoch nicht die negative Kontrolle) sollte zum Bibliothekspool hinzugefügt werden und mit dem Probenotyp „Control“ (Kontrolle) auf dem Probenblatt aufgeführt werden. Fügen Sie die negative Kontrolle nicht zur Probencharge oder zum Probenblatt hinzu.

NGS-Option 1

Die VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) erfordert für jede Fließzelle ein Probenblatt. Beim NGS-Option 1-Workflow werden die Probenblätter bei der Konfiguration des Sequenzierungslaufs hochgeladen und im Ausgabeordner als „SampleSheet.csv“ gespeichert. Das Probenblatt ist eine durch Kommas getrennte Datei mit zwei Abschnitten: einer Kopfzeile für die Erfassung von Informationen auf der Ausführungsebene und einem Datenabschnitt, der für die Erfassung probenspezifischer Attribute vorgesehen ist. NGS-Option 1 verwendet eine Fließzelle mit zwei Lanes. Derselbe Probenpool wird in beiden Lanes (1 und 2) verarbeitet. Bei der Eingabe der Probeninformationen in das Probenblatt muss jede Kombination aus Proben-ID, Well und Index in beiden Lanes (1 und 2) aufgeführt werden. Die Kombination aus Proben-ID, Well und Index muss innerhalb einer Lane eindeutig sein.

Überprüfen Sie, dass die Proben-ID-Zuordnung zu den entsprechenden Indizes korrekt ist. Eine genaue Zuordnung ist erforderlich, um die Probenintegrität sicherzustellen.

Beispielkopfzeilen und -datenabschnitte finden Sie in [Tabelle 5](#) und [Tabelle 6](#).



HINWEIS

Die Namenskonventionen in der folgenden Tabelle werden von der VeriSeq NIPT Analysis Software benötigt, um die NGS-Ausgabedateien importieren zu können.

Tabelle 5 Beispiel NGS-Option 1 – Probenblatt (Kopfzeile)

[Header] (Kopfzeile)	
IEMFileVersion	4
Investigator Name (Name des Prüfers)	
Experiment Name (Name des Versuchs)	H9KY7ADXX
Date (Datum)	
Workflow	GenerateFASTQ
Application (Anwendung)	Nur HiSeq FASTQ
Assay	TruSeq LT
Description (Beschreibung)	cfDNAHiSeqv1.0
Chemistry (Chemie)	Default (Standard)
[Reads]	
	36
[Settings] (Einstellungen)	

**HINWEIS**

In der Kopfzeile des Probenblatts muss die exakte Fließzellen-ID (in Großbuchstaben) im Feld „Experiment Name“ (Name des Versuchs) angegeben sein und das Feld „Description“ (Beschreibung) muss „cfDNAHiSeqv1.0“ enthalten.

Tabelle 6 Beispiel: NGS-Option-1 – Probenblatt (Datenabschnitt)

[Data] (Daten)										
Lane	Sample_ID (Proben-ID)	Sample_ Name (Probenname)	Sample_Plate (Probenplatte)	Sample_ Well (Proben- Well)	I7_ Index_ ID	Index	Sample_ Project (Proben- Projekt)	Description (Beschreibung)	SampleType (Probentyp)	Library_nM (Bibliothek_ nM)
1	Probe1	Probe1		A1	A002	CGATGT			Test	80,87774
1	Probe2	Probe2		B1	A005	ACAGTG			Test	75,3396
1	Probe3	Probe3		C1	A007	CAGATC			Test	87,35632
1	Probe4	Probe4		D1	A012	CTTGTA			Test	68,02508
1	Probe5	Probe5		E1	A013	AGTCAA			Test	97,49216
1	Probe6	Probe6		F1	A014	AGTTCC			Test	93,20794
1	Probe7	Probe7		G1	A018	GTCCGC			Test	63,63636
1	Probe8	Probe8		H1	A019	GTGAAA		Fehlgeschlagene Bibliothek	Test	5,2
1	Probe9	Probe9		A2	A001	ATCACG			Test	84,6395
1	Probe10	Probe10		B2	A003	TTAGGC			Test	81,5047
1	Probe11	Probe11		C2	A008	ACTTGA			Test	78,78788
1	Probe12	Probe12		D2	A010	TAGCTT			Test	83,17659
1	Probe13	Probe13		E2	A020	GTGGCC			Test	79,62382
1	Probe14	Probe14		F2	A022	CGTACG			Test	62,59143
1	Kontrollen-ID	Kontrollen-ID		G2	A025	ACTGAT			Control	65,20376
2	Probe1	Probe1		A1	A002	CGATGT			Test	80,87774
2	Probe2	Probe2		B1	A005	ACAGTG			Test	75,3396
2	Probe3	Probe3		C1	A007	CAGATC			Test	87,35632
2	Probe4	Probe4		D1	A012	CTTGTA			Test	68,02508
2	Probe5	Probe5		E1	A013	AGTCAA			Test	97,49216
2	Probe6	Probe6		F1	A014	AGTTCC			Test	93,20794
2	Probe7	Probe7		G1	A018	GTCCGC			Test	63,63636
2	Probe8	Probe8		H1	A019	GTGAAA		Fehlgeschlagene Bibliothek	Test	5,2
2	Probe9	Probe9		A2	A001	ATCACG			Test	84,6395

2	Probe10	Probe10	B2	A003	TTAGGC	Test	81,5047
2	Probe11	Probe11	C2	A008	ACTTGA	Test	78,78788
2	Probe12	Probe12	D2	A010	TAGCTT	Test	83,17659
2	Probe13	Probe13	E2	A020	GTGGCC	Test	79,62382
2	Probe14	Probe14	F2	A022	CGTACG	Test	62,59143
2	Kontrollen-ID	Kontrollen-ID	G2	A025	ACTGAT	Control	65,20376

Die Validierungsregeln für die Kopfzeile und den Datenabschnitt eines Probenblatts finden Sie in [Tabelle 7](#) und [Tabelle 8](#). Die Daten in jeder Zelle des Probenblatts dürfen aus maximal 100 Zeichen bestehen.



HINWEIS

Die Namenskonventionen in der folgenden Tabelle werden von der VeriSeq NIPT Analysis Software benötigt, um die NGS-Ausgabedateien importieren zu können.

Tabelle 7 Validierungsregeln für Probenblätter (Kopfzeile)

Feld	Erforderlich	Validierungsregeln
IEMFileVersion	Ja	Muss „4“ sein.
Investigator Name (Name des Prüfers)	Ja	Keine Validierungsregeln.
Experiment Name (Name des Versuchs)	Ja	Muss die Fließzellen-ID sein (in Großbuchstaben). Wird anhand des Barcodes von runParameters.xml validiert.
Date (Datum)	Ja	Keine Validierungsregeln.
Workflow	Ja	Keine Validierungsregeln.
Application (Anwendung)	Ja	Keine Validierungsregeln.
Assay	Ja	Keine Validierungsregeln.
Description (Beschreibung)	Ja	Muss „cfDNAHiSeqv1.0“ sein.
Chemistry (Chemie)	Ja	Keine Validierungsregeln.

Tabelle 8 NGS-Option-1-Probenblatt – Validierungsregeln (Datenabschnitt)

Spaltenname	Interpretation	Klasse	Gültige Einträge	Erforderlich	Validierungsregeln
Lane	Lane, in der sich die Probe befindet	Ganzzahl	1, 2	Ja	Muss „1“ oder „2“ sein.
Sample_ID (Proben-ID)	Proben-ID (wird für die Erstellung von Berichten zur cADAS-Ausgabe verwendet)	Zeichenfolge	Eindeutig pro Index innerhalb der Fließzelle	Ja	Bei der jeweiligen Proben-ID müssen außer der Angabe zur Lane alle Probenblattdatenwerte identisch sein. Die Proben-ID darf nur die alphanumerischen Zeichen a–z, A–Z und 0–9 sowie Unterstriche und Bindestriche („-“) enthalten. Die Proben-ID darf keine Leerzeichen enthalten. Vermeiden Sie mehrere nacheinanderfolgende Unterstriche und Gedankenstriche. Ab Version 1.4 darf die Proben-ID nicht mit einer Null (0) beginnen.
Sample_Name (Probenname)	Probenname	Zeichenfolge	Wird ignoriert	Nein	Dieses Feld kann leer sein. Es gelten hierfür keine Validierungsregeln. Der Name der Probe wird auf 100 Zeichen gekürzt.

Spaltenname	Interpretation	Klasse	Gültige Einträge	Erforderlich	Validierungsregeln
Sample_Plate (Probenplatte)	Probenplatten-ID	Zeichenfolge	PXXXX, wobei XXXX numerische Zeichen sind	Nein	Dieses Feld kann leer sein. Es gelten hierfür keine Validierungsregeln. Die Probenplatten-ID wird auf 100 Zeichen gekürzt.
Sample_Well (Proben-Well)	ID des Proben-Well	Zeichenfolge	A01–A08 B01–B08	Ja	Die Formate A1 und A01 werden unterstützt. Die Werte werden anhand eines regulären Ausdrucks validiert. Das erste Zeichen ist A–H und die folgenden zwei Zeichen können 1–12 oder 01–12 sein.
I7_Index_ID	Index-ID	Zeichenfolge	A00 –A024	Ja	Das erste Zeichen ist immer „A“ gefolgt von drei numerischen Ziffern (siehe Tabelle 12).
Index	Indexzusammensetzung	Zeichenfolge		Ja	Jede in Tabelle 12 aufgeführte Indexsequenz ist zulässig. Die Gesamtzahl der Indexwerte innerhalb einer bestimmten Lane muss mindestens acht betragen. Bei weniger als acht wird ein Fehler generiert. Eine zusätzliche Validierung wird durchgeführt, um die Wertepaare „I7_Index_ID“ und „Index“ abzugleichen. Für jede Lane müssen alle Indexwerte eindeutig sein.
Sample_Project (Proben- Projekt)	Projektname	Zeichenfolge	Wird ignoriert	Nein	Dieses Feld kann leer sein.
Description (Beschreibung)	Probenbeschreibung	Zeichenfolge	Wird ignoriert	Nein	Dieses Feld kann leer sein. Wird in diesem Feld das Wort „failed“ (fehlgeschlagen) angegeben, wird die Probe als fehlgeschlagen markiert und es werden keine Ergebnisse dafür ausgegeben.
SampleType (Probentyp)	Probentyp	Zeichenfolge	‘Patient’, ‘Test’, ‘Control’ (Kontrolle)	Ja	Muss „Patient“, „Test“ oder „Control“ (Kontrolle) sein. (Bei der Validierung wird die Groß-/Kleinschreibung beachtet.)
Library_nM (Bibliothek_nM)	Bibliothekskonzentration	Real	Numerische Werte	Ja	Muss numerisch sein.

Der Benutzer kann eine Probe von der Analyse ausschließen, indem er auf dem Probenblatt in das Beschreibungsfeld für die Probe „failed“ (fehlgeschlagen) eingibt (Groß-/Kleinschreibung wird nicht beachtet). Dadurch werden Proben, die aufgrund eines Vorsequenzierungsfehlers in der Qualitätssicherung nicht sequenziert werden, über den gesamten Workflow hinweg verfolgt. Der Wert im Feld für die Beschreibung der Probe ist in der Ausgabedatei enthalten und die Datenfelder enthalten Leerwerte.

NGS-Option 2

Der Laufkonfigurationsworkflow für NGS-Option 2 beinhaltet keine Option zum manuellen Hochladen eines Probenblatts bei der Laufkonfiguration. Nachdem ein neuer Lauf erkannt wurde, stellt der Benutzer stattdessen das Probenblatt `samplesheet.csv` in den Ausgabeordner des Laufs im Verzeichnis „runs“ auf dem Analyseserver. ATMS sendet dem Benutzer eine E-Mail mit dem Hinweis, dass nach dem Speichern der Datei `RunParameters.xml` im Laufordner auf dem Analyseserver „/data01/runs“ und nach dem Beginn der Sequenzierung ein neuer Lauf erkannt wurde. Das Probenblatt muss in den Laufordner gestellt werden, bevor der Sequenzierungslauf abgeschlossen ist (bevor die Datei `RTAComplete.txt` im Laufordner gespeichert wird).



HINWEIS

Wenn die Datei `samplesheet.csv` nicht im Ausgabeordner des Laufs steht, wenn die Datei `RTAComplete.txt` generiert wird, sendet die Analysesoftware eine Benachrichtigung. Weitere Informationen hierzu finden Sie in [Kapitel 2 Bedienung des Systems, Systembenachrichtigungen, Tabelle 4 auf Seite 10](#).

Bei Verwendung von NGS-Option 2 wird derselbe Probenpool von der gesamten Fließzelle verarbeitet. Die Lane-Nummern werden im Probenblatt nicht angegeben. Bei der Eingabe der Probeninformationen in das Probenblatt wird jede Kombination aus Proben-ID, Well und Index einmal im Datenabschnitt des Probenblatts angegeben. Jede Kombination aus Proben-ID, Well und Index muss eindeutig sein.

Überprüfen Sie, dass die Proben-ID-Zuordnung zu den entsprechenden Indizes korrekt ist. Eine genaue Zuordnung ist erforderlich, um die Probenintegrität sicherzustellen.

Beispielkopfeilen und -datenabschnitte finden Sie in [Tabelle 9](#) und [Tabelle 10](#).



HINWEIS

Die Namenskonventionen in der folgenden Tabelle werden von der VeriSeq NIPT Analysis Software benötigt, um die NGS-Ausgabedateien importieren zu können.

Tabelle 9 Beispiel NGS-Option 2 – Probenblatt (Kopfzeile)

[Header] (Kopfzeile)	
IEMFileVersion	4
Investigator Name (Name des Prüfers)	Name
Experiment Name (Name des Versuchs)	Fließzellen-ID
Date (Datum)	2/4/2014
Workflow	GenerateFASTQ
Application (Anwendung)	nur FASTQ
Assay	TruSeq LT
Description (Beschreibung)	cfDNANextSeqv1.0
Chemistry (Chemie)	Default (Standard)
[Reads]	
	36
[Settings] (Einstellungen)	
ReverseComplement	0



HINWEIS

In der Kopfzeile des Probenblatts muss die exakte Fließzellen-ID (in Großbuchstaben) im Feld „Experiment Name“ (Name des Versuchs) angegeben sein und das Feld „Description“ (Beschreibung) muss „cfDNANextSeqv1.0“ enthalten.

Tabelle 10 Beispiel NGS-Option 2 – Probenblatt (Datenabschnitt)

[Data] (Daten)									
Sample_ID (Proben-ID)	Sample_Name (Probenname)	Sample_Plate (Probenplatte)	Sample_Well (Proben-Well)	I7_Index_ID	Index	Sample_Project (Proben-Projekt)	Description (Beschreibung)	SampleType (Probentyp)	Library_nM (Bibliothek_nM)
Probe1	Probe1		A2	A002	CGATGT			Test	53,2
Probe2	Probe2		B2	A005	ACAGTG			Test	51
Probe3	Probe3		C2	A007	CAGATC			Test	83,3
Probe4	Probe4		D2	A012	CTTGTA			Test	79
Probe5	Probe5		E2	A013	AGTCAA			Test	67
Probe6	Probe6		F2	A014	AGTTCC			Test	44,3
Probe7	Probe7		G2	A018	GTCCGC			Test	61,9
Probe8	Probe8		H2	A019	GTGAAA			Test	62,9
Probe9	Probe9		A4	A001	ATCACG			Test	76,8
Probe10	Probe10		B4	A003	TTAGGC			Test	71,1
Probe11	Probe11		C4	A008	ACTTGA		Qualitätssicherung fehlgeschlagen	Test	5
Probe12	Probe12		D4	A010	TAGCTT			Test	71,1
Probe13	Probe13		E4	A020	GTGGCC			Test	55
Probe14	Probe14		F4	A022	CGTACG			Test	88,6
Kontrollen-ID	Kontrollen-ID		G4	A025	ACTGAT			Control	64,7

Die Probenblatt-Validierungsregeln für Datenabschnitte sind in [Tabelle 11](#) aufgeführt. Die Daten in jeder Zelle des Probenblatts dürfen aus maximal 100 Zeichen bestehen.

Tabelle 11 NGS-Option-2-Probenblatt – Validierungsregeln (Datenabschnitt)

Spaltenname	Interpretation	Klasse	Gültige Einträge	Erforderlich	Validierungsregeln
Sample_ID (Proben-ID)	Proben-ID (wird für die Erstellung von Berichten zur cADAS-Ausgabe verwendet)	Zeichenfolge	Eindeutig pro Index innerhalb der Fließzelle	Ja	Die Proben-ID darf nur die alphanumerischen Zeichen a–z, A–Z und 0–9 sowie Unterstriche und Bindestriche („-“) enthalten. Die Proben-ID darf keine Leerzeichen enthalten. Vermeiden Sie mehrere nacheinanderfolgende Unterstriche und Bindestriche. Ab Version 1.4 darf die Proben-ID nicht mit einer Null (0) beginnen.
Sample_Name (Probenname)	Probenname	Zeichenfolge	Freier Text	Nein	Dieses Feld kann leer sein. Es gelten hierfür keine Validierungsregeln. Der Name wird auf 100 Zeichen gekürzt.
Sample_Plate (Probenplatte)	Probenplatten-ID	Zeichenfolge	PXXXX, wobei XXXX numerische Zeichen sind	Nein	Dieses Feld kann leer sein. Es gelten hierfür keine Validierungsregeln. Die Probenplatten-ID wird auf 100 Zeichen gekürzt.
Sample_Well (Proben-Well)	ID des Proben-Wells	Zeichenfolge	A01–A08 B01–B08	Ja	Die Formate A1 und A01 werden unterstützt. Die Werte werden anhand eines regulären Ausdrucks validiert. Das erste Zeichen ist A–H und die folgenden zwei Zeichen können 1–12 oder 01–12 sein.
I7_Index_ID	Index-ID	Zeichenfolge	A00 –A024	Ja	Das erste Zeichen ist immer „A“ gefolgt von drei numerischen Ziffern.
Index	Indexzusammensetzung	Zeichenfolge		Ja	Jede in Tabelle 12 aufgeführte Indexsequenz ist zulässig. Die Gesamtzahl der Indexwerte innerhalb einer bestimmten Lane muss mindestens acht betragen. Bei weniger als acht wird ein Fehler generiert. Eine zusätzliche Validierung wird durchgeführt, um die Wertepaare „I7_Index_ID“ und „Index“ abzugleichen. Für jedes Probenblatt sind alle Indexwerte eindeutig. Es dürfen keine doppelten Werte vorkommen.
Sample_Project (Proben-Projekt)	Projektname	Zeichenfolge	Wird ignoriert	Nein	Dieses Feld kann leer sein.

Spaltenname	Interpretation	Klasse	Gültige Einträge	Erforderlich	Validierungsregeln
Description (Beschreibung)	Probenbeschreibung	Zeichenfolge	Wird ignoriert	Nein	Dieses Feld kann leer sein. Wird in diesem Feld das Wort „failed“ (fehlgeschlagen) angegeben, wird die Probe als fehlgeschlagen markiert und es werden keine Ergebnisse dafür ausgegeben.
SampleType (Probentyp)	Probentyp	Zeichenfolge	'Patient', 'Test', 'Control' (Kontrolle)	Ja	Muss „Patient“, „Test“ oder „Control“ (Kontrolle) sein. (Bei der Validierung wird die Groß-/Kleinschreibung beachtet.)
Library_nM (Bibliothek_nM)	Bibliothekskonzentration	Real	Numerische Werte	Ja	Muss numerisch sein.

Der Benutzer kann eine Probe von der Analyse ausschließen, indem er auf dem Probenblatt in das Beschreibungsfeld für die Probe „failed“ (fehlgeschlagen) eingibt (Groß-/Kleinschreibung wird nicht beachtet). Dadurch werden Proben, die aufgrund eines Vorsequenzierungsfehlers in der Qualitätssicherung nicht sequenziert werden, über den gesamten Workflow hinweg verfolgt. Der Wert im Feld für die Beschreibung der Probe ist in der Ausgabedatei enthalten und die Datenfelder enthalten Leerwerte. Siehe [Tabelle 12](#) für gültige Indexwerte.

Gültige Indexwerte

Tabelle 12 Gültige Indexwerte

i7_Index_ID	Index
A001	ATCACG
A002	CGATGT
A003	TTAGGC
A004	TGACCA
A005	ACAGTG
A006	GCCAAT
A007	CAGATC
A008	ACTTGA
A009	GATCAG
A010	TAGCTT
A011	GGCTAC
A012	CTTGTA
A013	AGTCAA
A014	AGTTCC
A015	ATGTCA
A016	CCGTCC
A018	GTCCGC
A019	GTGAAA
A020	GTGGCC
A021	GTTTCG
A022	CGTACG
A023	GAGTGG
A025	ACTGAT
A027	ATTCCT

Demultiplexierung und FASTQ-Generierung

NGS-Option 1 verwendet einen anwendungsspezifischen Demultiplexer. NGS-Option 2 verwendet den bcl2fastq v2-Konvertierer für die Demultiplexierung und die FASTQ-Generierung. Beide Analyseoptionen erzeugen neben der ursprünglichen Datei SampleSheet.csv eine zusätzliche Probenblatt-bezogene Datei im Laufordner.

- ▶ **SampleSheet.csv:** Das ursprüngliche, vom Benutzer bereitgestellte Probenblatt.
- ▶ **sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt:** Eine Datei, die nach dem Einlesen des vom Benutzer bereitgestellten Probenblatts von ATMS generiert wird. Diese Datei enthält die Informationen, die an nachfolgende Datenanalyseschritte übergeben werden.



HINWEIS

Greifen Sie nicht auf das Probenblatt zu, während die Analyse durchgeführt wird, es sei denn, Sie werden im Datenblattvalidierungsschritt diesbezüglich angewiesen.

Analyse erneut in die Warteschlange stellen



HINWEIS

Versuchen Sie ein erneutes Einstellen NUR dann, wenn Sie vom Server eine E-Mail-Benachrichtigung über einen Fehler erhalten, der ein Probenblatt betrifft.

Sie können Ihren Lauf für die Analyse noch einmal in die Warteschlange stellen, wenn Ihr Probenblatt Fehler enthält, die weder die Validierung noch die Analyse betreffen. Die unten beschriebenen Änderungen am Probenblatt sollten nur erfolgen, wenn eine E-Mail-Benachrichtigung vom Server empfangen wird, die einen Fehler im Probenblatt meldet. Beispiel:

- ▶ Leere Zeilen oder Spalten
- ▶ Fehlende Kopfzeile
- ▶ Nicht unterstützter Workflow in der Kopfzeile „Description“ (Beschreibung)
- ▶ Falscher Fließzellen-Barcode

Laufordner befindet sich auf dem Server

Dieses Verfahren beschreibt das erneute Einstellen einer Analyse in die Warteschlange, wenn sich Ihr Laufordner auf dem Server befindet.

- 1 Öffnen Sie auf einem Computer, der sich im selben Netzwerk wie der Analyseserver befindet, den Windows-Explorer und navigieren Sie zum Ordner „/runs“.
- 2 Suchen Sie den Laufordner, den Sie für die Analyse wieder in die Warteschlange stellen möchten.
- 3 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Laufordner und klicken Sie auf **Copy** (Kopieren).
- 4 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf eine beliebige Stelle im Ordner „/runs“ und klicken Sie auf **Paste** (Einfügen).
Es wird eine Kopie des Laufordners erstellt, wobei der Ordnername durch den Begriff „- Copy“ (Kopie) ergänzt wird. Beispiel: Laufordner_Name - Copy.
Das System sendet eine E-Mail-Benachrichtigung über ungültige Zeichen im Ordnernamen, die Sie ignorieren können.



HINWEIS

Fahren Sie erst dann mit dem nächsten Schritt fort, wenn der Laufordner vollständig kopiert ist. Dies nimmt etwa 30 Minuten in Anspruch.

- 5 Öffnen Sie den kopierten Laufordner und löschen Sie folgende Datei:
sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt
- 6 Bearbeiten Sie im kopierten Laufordner die Datei SampleSheet.csv, um die Fehler zu korrigieren. Entfernen Sie alle leeren Zeilen und Spalten.
- 7 Speichern Sie das Probenblatt im kopierten Laufordner als SampleSheet.csv, um die vorhandene Datei zu überschreiben.
Stellen Sie sicher, dass die Datei das CSV-Format (Comma Separated Value, durch Trennzeichen getrennte Werte) beibehält. Einige Tabellensoftwarepakete können das Dateiformat ohne Ausgabe von Warnungen ändern und Kommas durch andere Symbole ersetzen. Ändern Sie das Probenblatt nicht mehr, nachdem Sie es im kopierten Laufordner gespeichert haben.

- 8 Zur Einleitung der Analyse benennen Sie den kopierten Laufordner folgendermaßen um:
 - a Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den kopierten Laufordner und klicken Sie dann auf **Rename** (Umbenennen).
 - b Ersetzen Sie die Leerzeichen und den Bindestrich durch einen Unterstrich (_). Beispiel: Laufordner_Name_Copy.



HINWEIS

Fügen Sie vor dem Ordnernamen keine Zeichen ein. Beispiel: Copy_Laufordner_Name. Fügen Sie nur am Ende des Laufordnernamens Zeichen hinzu. Zulässig sind nur die folgenden alphanumerischen Zeichen: a–z, A–Z, 0–9 und Unterstriche („_“). Leerzeichen, Bindestriche und andere Zeichen sind nicht erlaubt.

Das System wird den Ordner Laufordner_Name_Copy automatisch analysieren.

- 9 Wenn die Datei sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt nicht innerhalb von 30 Minuten erstellt wird, lesen Sie *Analyse erneut in die Warteschlange stellen – Fehlerbehebung auf Seite 38*.

Abgeschlossenen Lauf auf den Server kopieren und für die Analyse in die Warteschlange stellen

Dieses Verfahren beschreibt das manuelle Kopieren eines Laufordners auf den Server und das Einstellen in die Warteschlange für die Analyse.



HINWEIS

Halten Sie sich genau an die unten angegebene Reihenfolge des Verfahrens.

Die Schritte 1–5 müssen vor dem Kopieren des Laufordners auf den Analyseserver durchgeführt werden.

- 1 Öffnen Sie den Laufordner und verschieben Sie die Datei **RTAcomplete.txt** an einen anderen Speicherort außerhalb des Laufordners.
- 2 Löschen Sie die folgende Datei im Laufordner:
sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt
- 3 Bearbeiten Sie bei Bedarf Ihr ursprüngliches Probenblatt, um Fehler zu korrigieren oder sonstige Änderungen vorzunehmen. Entfernen Sie alle leeren Zeilen und Spalten.
- 4 Speichern Sie das Probenblatt im Laufordner als SampleSheet.csv, um die vorhandene Datei zu überschreiben.
Ändern Sie das Probenblatt nicht mehr, nachdem Sie es im Laufordner gespeichert haben.
- 5 Stellen Sie sicher, dass der Laufordner noch nicht die Datei RTAComplete.txt enthält.
- 6 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Laufordner und klicken Sie auf **Copy** (Kopieren).
- 7 Öffnen Sie auf einem Computer, der sich im selben Netzwerk wie der Analyseserver befindet, den Windows-Explorer und navigieren Sie zum Ordner „/runs“.
- 8 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf eine beliebige Stelle im Ordner „/runs“ und klicken Sie auf **Paste** (Einfügen).



HINWEIS

Fahren Sie erst dann mit dem nächsten Schritt fort, wenn der Laufordner vollständig kopiert ist. Dies nimmt etwa 30 Minuten oder mehr in Anspruch, abhängig von der Netzwerkgeschwindigkeit.



Fügen Sie vor dem Ordnernamen keine Zeichen ein. Beispiel: Copy_Laufordner_Name. Fügen Sie nur am Ende des Laufordnernamens Zeichen hinzu. Zulässig sind nur die folgenden alphanumerischen Zeichen: a–z, A–Z, 0–9 und Unterstriche („_“). Leerzeichen, Bindestriche und andere Zeichen sind nicht erlaubt.

- 9 Zur Einleitung der Analyse kopieren Sie die Datei **RTAcomplete.txt** von dem Speicherort, an den Sie sie verschoben haben, und fügen Sie sie im Laufordner ein.
Das System wird den Laufordner automatisch erneut analysieren.
- 10 Wenn die Datei `sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt` nicht innerhalb von 30 Minuten erstellt wird, lesen Sie *Analyse erneut in die Warteschlange stellen – Fehlerbehebung auf Seite 38*.

Analyse erneut in die Warteschlange stellen – Fehlerbehebung

- 1 Prüfen Sie, ob Sie eine E-Mail mit Fehlermeldungen erhalten haben.
- 2 Überprüfen Sie, ob die E-Mail Informationen über Fehler im Probenblatt enthält.
Überprüfen Sie die gesamte E-Mail-Nachricht, da die relevanten Fehlermeldungen möglicherweise erst am Ende der Nachricht aufgeführt werden.
- 3 Wenn es sich um Fehler handelt, die Sie korrigieren können, wiederholen Sie das Verfahren zum erneuten Einstellen der Analyse in die Warteschlange, das für Ihren Laufordner gilt.
- 4 Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina, falls Folgendes auftritt:
 - ▶ Sie erhalten keine E-Mail mit Fehlermeldungen.
 - ▶ Die Analyse wird nicht ausgeführt.
 - ▶ Das Probenblatt enthält keine Fehler
 Erwähnen Sie bei Ihrem Anruf „NIPT16“ bzw. geben Sie diesen Begriff in der Betreffzeile Ihrer E-Mail an.

Archivierung und Sicherung von Daten

Illumina empfiehlt die Archivierung der Verzeichnisse `/data01/runs` und `/data01/analysis_output` entsprechend der lokalen IT-Site-Archivierungsrichtlinie. Die Software überwacht den verbleibenden Speicherplatz in den Verzeichnissen `/data01/runs` und benachrichtigt den Benutzer per E-Mail, wenn die Speicherkapazität unter 200 GB sinkt.

Der VeriSeq NIPT Analysis Server ist nicht zum Speichern von Daten vorgesehen. Archivieren Sie daher die Daten in regelmäßigen Abständen an einem anderen Speicherort.

Für einen typischen Sequenzierungslauf, der mit dem cfDNA-Analyse-Workflow kompatibel ist, sind an Speicherplatz ungefähr 11 bis 13 GB für NGS-Option 1 und ungefähr 11 bis 16 GB für NGS-Option 2 erforderlich. Die tatsächliche Größe des Laufordners hängt von der endgültigen Clusterdichte ab. Der Server bietet mehr als 4 TB an Speicherplatz, also ausreichend Speicherplatz für mehr als 200 Sequenzierungsläufe.

Archivieren Sie Daten nur dann, wenn sich das System im Leerlauf befindet und keine Analyse- oder Sequenzierungsläufe durchgeführt werden.

Berichtspezifikationen und Interpretieren von Kennzahlen

Der Ausgabeordner für die cfDNA-Sequenzierungsanalyse enthält zwei Textdateien in kommagetrenntem Format (CSV). Die erste Datei, <Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv, enthält alle Proben- und Fließzellendaten und die Kennzahlen der Qualitätssicherung. Diese Datei gibt auch die Version der Software an, die zur Generierung der Ergebnisse verwendet wurde. Die zweite Datei, <Laufordner_Name>_Misindexed_Results.csv, ordnet die Anzahl der Fließzellenlesevorgänge für die bei der Demultiplexierung identifizierten Indizes tabellarisch, die auf dem Probenblatt nicht angegeben sind. Eine dritte Textdatei, REPORT.Complete.txt, befindet sich im Ausgabeordner für die Ergebnisse. Diese Datei enthält Informationen über die Analysekonfiguration, die Analysezeit, den Speicherort der Ausgabedateien sowie die MD5-Prüfsummenwerte für die Dateien NIPT_Results.csv und MISINDEXED_Results.csv. Die vollständige Liste der Kennzahlen der Qualitätssicherung und anderer Werte finden Sie unter *Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 1)* auf Seite 44 und *Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 2)* auf Seite 51.



VORSICHT

Um eine versehentliche Änderung der ursprünglichen Analyseausgabe zu verhindern, kopieren Sie die Dateien <Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv und <Laufordner_Name>_Misindexed_Results.csv auf einen anderen Computer, bevor Sie die Dateien öffnen und bearbeiten.



HINWEIS

Illumina empfiehlt, die durch die cfDNA-Analyse bzw. von der VeriSeq NIPT Analysis-Software generierten Dateien in ein Laborinformations- und Managementsystem zu integrieren. Dort können mithilfe der Informationen Patientenberichte für die anschließende Überprüfung durch das klinische Laborpersonal erstellt werden.

Tabelle 13 Gemeldete Probenblatt-Annotationswerte (<Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv)

Spaltenname	Feld auf dem ursprünglichen Probenblatt
SampleID (Proben-ID)	Sample_ID (Proben-ID)
SampleType (Probentyp)	SampleType (Probentyp)
Flowcell ID (Fließzellen-ID)	Experiment Name (Name des Versuchs)
IndexID (Index-ID)	I7_Index_ID
Well	Sample_Well (Proben-Well)
Library_nM (Bibliothek_nM)	Library_nM (Bibliothek_nM)

Tabelle 14 Gemeldete Score-Kennzahlen pro Probe (<Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv)

Spaltenname	Interpretation
Ratio_13 (Verhältnis 13)	Chromosomenverhältnis 13
Ratio_18 (Verhältnis 18)	Chromosomenverhältnis 18
Ratio_21 (Verhältnis 21)	Chromosomenverhältnis 21
Ratio_X (Verhältnis X)	Chromosomenverhältnis X
Ratio_Y (Verhältnis Y)	Chromosomenverhältnis Y
NCV_13	Normalisierter Chromosomenwert (z-Wert) 13
NCV_18	Normalisierter Chromosomenwert (z-Wert) 18
NCV_21	Normalisierter Chromosomenwert (z-Wert) 21

Spaltenname	Interpretation
NCV_X	Normalisierter Chromosomenwert (z-Wert) X
NCV_Y	Normalisierter Chromosomenwert (z-Wert) Y
FF_Formatted (FF formatiert)	Geschätzter fetaler Bestandteil von cfDNA, der vom Assay zurückgewonnen wurde. Wird als diskreter, gerundeter Prozentsatz ausgegeben, der zusätzliche Informationen zu jeder Probe bietet.

Tabelle 15 Gemeldete Kennzahlen der Qualitätssicherung pro Probe (<Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv)

Spaltenname	Interpretation	Fehlergründe
QCFlag	Gesamtindikator für Qualitätssicherung: erfolgreich (0), Warnung (1), fehlgeschlagen (2)	Siehe Tabelle 20.
QCWarning	Verkettung aller Gründe der Probenwarnung (durch „;“ getrennt)	Siehe Tabelle 20.
QCFailure	Verkettung aller Gründe für das Fehlschlagen der Probe (durch „;“ getrennt)	Siehe Tabelle 20.
Cluster	Gesamtzahl der Cluster über Lanes hinweg (pro Fließzelle gemeldet)	Niedrige/hohe Clusterdichte
TotalReads2Clusters	Verhältnis der wiederhergestellten Reads gegenüber der Anzahl der Cluster über Lanes hinweg (pro Fließzelle gemeldet)	Beschädigte BCL-Dateien
MaxMisindexedReads2Clusters	Verhältnis der falsch indizierten Reads über Lanes hinweg gegenüber Clustern in einer virtuellen Lane (pro Fließzelle gemeldet)	Über Lanes hinweg gefundene Reads mit unerwarteten Indizes
IndexedReads	Gesamtzahl der indizierten Reads pro Probe über Lanes hinweg	Technische Index-Read-Probleme; falsche Proben auf den Sequenzierungs-Lanes
TotalIndexedReads2Clusters	Verhältnis der indizierten Reads gegenüber Clustern (pro Fließzelle gemeldet)	Technische Index-Read-Probleme
Tags	Anzahl der Reads, die einer eindeutigen Position im Genom zugeordnet sind	Hohe PCR- oder Sequenzierungsfehlerrate; Verzerrung bei der Bibliothekserzeugung
NonExcludedSites	Anzahl der Tags außer gefilterter Genomregionen und doppelter Reads, die derselben Position zugeordnet sind	Niedrige Clusterzahl, Sequenzierungsfehler, niedrige Bibliothekskomplexität, normalerweise nach erneutem Lauf wiederherstellbar
NonExcludedSites2Tags	Verhältnis der NonExcludedSites gegenüber Tags	Bibliothekskomplexität
Tags2IndexedReads	Verhältnis der Tags gegenüber indizierter Reads	Höher als erwartete Anzahl von Reads, die sich nicht am Genom ausrichten
PerfectMatchTags2Tags	Verhältnis der perfekt zugeordneten Tags gegenüber allen Tags	Hohe Sequenzierungs- oder PCR-Fehlerrate
GCBias	Rest-GC-Verzerrung in der Read-Verteilung nach der Korrektur	Präanalytische Fehler bei der Probensammlung/behandlung; Sequenzierungsartefakte
GCR2	R2 der GC-Korrektur (Prozentsatz der Varianz, die durch die GC-Korrektur erklärbar ist)	

Spaltenname	Interpretation	Fehlergründe
NCD_13	Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom 13-Denominatoren	Unerwartetes Profil für Chromosomen des Typs Chromosom 13-Denominator
NCD_18	Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom 18-Denominatoren	Unerwartetes Profil für Chromosomen des Typs Chromosom 18-Denominator
NCD_21	Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom 21-Denominatoren	Unerwartetes Profil für Chromosomen des Typs Chromosom 21-Denominator
NCD_X	Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom X-Denominatoren	Unerwartetes Profil für Chromosomen des Typs Chromosom X-Denominator
NCD_Y	Wahrscheinlichkeitswert für das gesamte Chromosomenprofil	Unerwartetes Profil für alle Chromosomen

Tabelle 16 Gemeldete Score-Kennzahlen pro Probe (<Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv)

Spaltenname	Interpretation
Chr1, ..., Chr22, ChrX, ChrY	Gesamtzahl der zur Analyse eines entsprechenden Chromosoms verwendeten NonExcludedSites (Ganzzahlwert)
Chr1_Coverage, ..., Chr22_Coverage, ChrX_Coverage, ChrY_Coverage	Normalisierte Abdeckung jedes Chromosoms, das bei der Auswertung von Chromosomenverhältnissen verwendet wird

Tabelle 17 Gemeldete Score-Kennzahlen pro Stapel (<Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv)

Spaltenname	Interpretation
Median_13, Median_18, Median_21, Median_X, Median_Y	Stapel-Medianwert der Chromosomenverhältnisse für putative diploide Proben Hinweis: chrX und chrY basieren nur auf putativen weiblichen Proben
Stdev_13, Stdev_18, Stdev_21, Stdev_X, Stdev_Y	Stapel-Standardabweichung der Chromosomenverhältnisse für putative diploide Proben Hinweis: chrX und chrY basieren nur auf putativen weiblichen Proben

Tabelle 18 Pro Probe gemeldet, weitere Felder aus dem Probenblatt (<Laufordner_Name>_NIPT_Results.csv)

Spaltenname	Feld auf dem ursprünglichen Probenblatt
SampleProject (Probenprojekt)	Sample_Project (Proben-Projekt)
Description (Beschreibung)	Description (Beschreibung)
Index	Index

Tabelle 19 Gemeldete falsch indizierte Reads pro Fließzelle (<Laufordner_Name>_Misindexed_Results.csv)

Spaltenname	Interpretation
Flow Cell (Fließzelle)	Fließzellen-ID
Lane	Lane-ID
IndexID	Index-ID Hinweis: Index-ID A000 – ist jede Sequenz mit Ausnahme der 24 in Tabelle 12 aufgeführten Indizes
IndexedReads (indizierte Reads)	Anzahl der indizierten Reads innerhalb der Fließzelle/der Lane/des Indexes

Verifizieren, dass ATMS ausgeführt wird

Wenn das System automatisch gestartet wird, wird der ATMS-Hintergrundprozess für die Überwachung von Sequenzierungs- und Analyseläufen gestartet.

So vergewissern Sie sich, dass ATMS ausgeführt wird:

- 1 Führen Sie als „sbsuser“ den Befehl zum Herstellen einer Verbindung mit dem Analyseserver aus (vorausgesetzt \$HOSTNAME ist der Name des Servers, der während des anfänglichen Installationsvorgangs eingerichtet wurde):
`ssh -l sbsuser $HOSTNAME`
- 2 Führen Sie den Befehl zum Überprüfen des ATMS-Prozesses aus:
`ps aux | grep jsvc`

Wenn die Ausgabe „jsvc.exec“ enthält, wird der ATMS-Prozess im Hintergrund ausgeführt. Es gibt drei Ausgabezeilen: 1) eine Zeile, die eine Instanz angibt, die vom Root-Benutzer ausgeführt wird, 2) eine Zeile, die eine Instanz angibt, die vom ATMS-Benutzer ausgeführt wird, und 3) eine Zeile, die eine Instanz angibt, die vom aufrufenden Benutzer ausgeführt wird.

Falls der ATMS-Prozess nicht ausgeführt wird, überwacht und verarbeitet ATMS neue Läufe erst dann, wenn der Dienst neu gestartet wurde. Das Herunterfahren oder Neustarten des Systems löst einen automatischen Neustart des Dienstes aus. Ein Servicetechniker von Illumina kann mithilfe von Root-Rechten den Dienst auf dem System neu starten.



HINWEIS

Falls das System unerwartet heruntergefahren wurde, versucht es selbstständig, ATMS neu zu starten.

Kennzahlen der Qualitätssicherung

Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 1)	44
Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 2)	51

Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 1)

Tabelle 20 NGS-Geräteoption 1: Position zweier Fließzellen, Fließzelle mit zwei Lanes: Die Kennzahlen der Qualitätssicherung, obere und untere Grenzen, Bezeichnung als Fehler oder Warnung, erwartete Fehler-/Warnrate und die potenziellen Ursachen.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Qualitätssicherung Zählung	Cluster	250.000.000	450.000.000	Warnung		< 5 % Fließzellen	Niedrige (eher wahrscheinlich) oder hohe (äußert unwahrscheinlich) Clusterdichte.
Qualitätssicherung Zählung	Reads2Clusters	0,95	1	Warnung		< 1 % Fließzellen	Die Software konnte nicht mehr als 5 % der vom Gerät aufgezeichneten Reads wiederherstellen.
Qualitätssicherung Zählung	MaxMisindexedReads2Clusters	0	0,0002	Warnung		< 0,1 %	
Qualitätssicherung Zählung	TotalIndexedReads2Clusters	0,7	1	Warnung		< 0,1 %	Indexsequenzfehler.
Qualitätssicherung Zählung	NonExcludedSites	8000000	100000000	Fehler		<= 2 %	Schlechte Bibliothek oder falsche Bibliotheksquantifizierung; niedrige Clusterzahlen; ggf. nach erneuter Ausführung von Plasma wiederherstellbar.
Qualitätssicherung Zählung	NonExcludedSites2Tags	0,8	1	Warnung		< 0,1 %	Geringe Bibliotheksdiversität; ggf. nach erneuter Ausführung von Plasma wiederherstellbar.
Qualitätssicherung Zählung	Tags2Reads	0,75	0,9	Warnung		< 0,1 %	Hohe Fehlerrate bei Sequenzierung oder PCR; ggf. nach einer Resequenzierung derselben Bibliothek wiederherstellbar.
Qualitätssicherung Zählung	PerfectMatchTags2Tags	0,7	1	Warnung		1 %	Hohe Fehlerrate bei Sequenzierung oder PCR; ggf. nach einer Resequenzierung derselben Bibliothek wiederherstellbar.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/ Warnung	Proben- typ	Erwartete Fehler-/ Warrate	Potenzielle Ursachen
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_13	0,1986891	0,2012977	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_18	0,2483363	0,2517526	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_21	0,2476093	0,2524342	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warrate	Potenzielle Ursachen
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_X	0,3260502	0,3396256	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_Y	0	1,47E-08	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_13	0	6,73E-04	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_18	0	1,37E-03	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warrate	Potenzielle Ursachen
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_21	0	1,33E-03	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_X	0	3,27E-03	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_Y	0	4,94E-09	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_13	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/ Warnung	Proben- typ	Erwartete Fehler-/ Warnrate	Potenzielle Ursachen
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_18	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_21	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_X	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_Y	-100	1.000	Fehler		< 0,5 %	Unerwartete Chromosomendarstellung irgendwo im Genom; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warrate	Potenzielle Ursachen
Normalisierter Chromosomenwert (Normalized Chromosomal Value, NCV) von Kontrollproben	NCV_13	-5	4	Warnung	Control		NCV-Grenzen für Kontrollen (keine Monosomie, keine Trisomie).
Normalisierter Chromosomenwert (Normalized Chromosomal Value, NCV) von Kontrollproben	NCV_18	-5	4	Warnung	Control		NCV-Grenzen für Kontrollen (keine Monosomie, keine Trisomie).
Normalisierter Chromosomenwert (Normalized Chromosomal Value, NCV) von Kontrollproben	NCV_21	-5	4	Warnung	Control		NCV-Grenzen für Kontrollen (keine Monosomie, keine Trisomie).
NCV von Testproben	NCV_13	-5	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
NCV von Testproben	NCV_18	-5	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
NCV von Testproben	NCV_21	-5	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
NCV von Testproben	NCV_X	-100	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warrate	Potenzielle Ursachen
NCV von Testproben	NCV_Y	-6	2.000	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
GC-Verzerrung von Kontrollproben	GCBias	-0,5	0,5	Warnung	Control		Verbleibende GC-Verzerrung nach GC-Korrektur (voraussichtlich +- 0, nur zu Informationszwecken).
GC-Verzerrung von Testproben	GCBias	-0,5	0,5	Warnung	Test		Verbleibende GC-Verzerrung nach GC-Korrektur (voraussichtlich +- 0, nur zu Informationszwecken).
GC R2 von Kontrollproben	GC R2	0	0,9999	Warnung	Control		R ² im Zusammenhang mit der GC-Korrektur (nur zu Informationszwecken).
GC R2 von Testproben	GC R2	0	0,9999	Warnung	Test		R ² im Zusammenhang mit der GC-Korrektur (nur zu Informationszwecken).

Kennzahlen der Qualitätssicherung und obere und untere Grenzen (NGS-Option 2)

Tabelle 21 NGS-Geräteoption 2: Position einer Fließzelle, Fließzelle mit vier Lanes: Die Kennzahlen der Qualitätssicherung, obere und untere Grenzen, Bezeichnung als Fehler oder Warnung, erwartete Fehler-/Warnrate und die potenziellen Ursachen.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Qualitätssicherung Zählung	Cluster	300.000.000	800.000.000	Warnung		< 5 % Fließzellen	Niedrige (eher wahrscheinlich) oder hohe (äußert unwahrscheinlich) Clusterdichte.
Qualitätssicherung Zählung	MaxMisindexedReads2Clusters	0	0,0002	Warnung		< 0,1 %	
Qualitätssicherung Zählung	TotallIndexedReads2Clusters	0,7	1	Warnung		< 0,1 %	Indexsequenzfehler.
Qualitätssicherung Zählung	NonExcludedSites	8000000	100000000	Fehler		<= 2 %	Schlechte Bibliothek oder falsche Bibliotheksquantifizierung; niedrige Clusterzahlen; ggf. nach erneuter Ausführung von Plasma wiederherstellbar.
Qualitätssicherung Zählung	NonExcludedSites2Tags	0,8	1	Warnung		< 0,1 %	Geringe Bibliotheksdiversität; ggf. nach erneuter Ausführung von Plasma wiederherstellbar.
Qualitätssicherung Zählung	Tags2Reads	0,75	0,9	Warnung		< 0,1 %	Hohe Fehlerrate bei Sequenzierung oder PCR; ggf. nach einer Resequenzierung derselben Bibliothek wiederherstellbar.
Qualitätssicherung Zählung	PerfectMatchTags2Tags	0,7	1	Warnung		1 %	Hohe Fehlerrate bei Sequenzierung oder PCR; ggf. nach einer Resequenzierung derselben Bibliothek wiederherstellbar.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_13	0,1991238	0,2008629	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_18	0,2489057	0,2511832	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_21	0,2484135	0,25163	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_X	0,329444	0,3362317	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Median der Chromosomenverhältnisse	Median_Y	0	1,236665e-08	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hoher/niedriger Median der Chromosomenverhältnisse über die gesamte Fließzelle hinweg; starker nicht korrigierter Stapeleffekt, der entweder mit der Extraktion oder dem Bibliotheksstapel einhergeht. Versuchen Sie, das Problem zu lösen, indem Sie die Plasmaproben erneut verarbeiten.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_13	0	0,0008695377	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_18	0	0,00113876	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_21	0	0,001608292	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_X	0	0,005090769	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.
Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen	Stdev_Y	0	3,454837e-09	Warnung		< 0,1 %	Unerwartet hohe Standardabweichung bei Chromosomenverhältnissen, was auf zusätzliche Quellen bisher unbeobachteter Varianz schließen lässt; achten Sie auf die Entwicklungstendenz.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_13	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_18	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_21	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_X	-50	1.000	Fehler		< 0,1 %	Unerwartete Chromosomendarstellung von Denominator-(Referenz-)Chromosomen; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
Wahrscheinlichkeitswert für Chromosom-Denominatoren	NCD_Y	-100	1.000	Fehler		< 0,5 %	Unerwartete Chromosomendarstellung irgendwo im Genom; wahrscheinlich nicht durch erneutes Ausführen der Probe zu lösen; deutet auf „Daten außerhalb des erwarteten Bereichs“ hin.
Normalisierter Chromosomenwert (Normalized Chromosomal Value, NCV) von Kontrollproben	NCV_13	-5	4	Warnung	Control		NCV-Grenzen für Kontrollen (keine Monosomie, keine Trisomie).
Normalisierter Chromosomenwert (Normalized Chromosomal Value, NCV) von Kontrollproben	NCV_18	-5	4	Warnung	Control		NCV-Grenzen für Kontrollen (keine Monosomie, keine Trisomie).
Normalisierter Chromosomenwert (Normalized Chromosomal Value, NCV) von Kontrollproben	NCV_21	-5	4	Warnung	Control		NCV-Grenzen für Kontrollen (keine Monosomie, keine Trisomie).
NCV von Testproben	NCV_13	-5	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
NCV von Testproben	NCV_18	-5	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
NCV von Testproben	NCV_21	-5	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).

Kategorie	Kennzahl	Untere Grenze	Obere Grenze	Fehler/Warnung	Proben-typ	Erwartete Fehler-/Warnrate	Potenzielle Ursachen
NCV von Testproben	NCV_X	-100	200	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
NCV von Testproben	NCV_Y	-6	2.000	Warnung	Test		NCV-Grenzen für Testproben (keine Monosomie, fetale Fraktion innerhalb des (großzügig bemessenen) erwarteten Bereichs).
GC-Verzerrung von Kontrollproben	GCBias	-0,5	0,5	Warnung	Control		Verbleibende GC-Verzerrung nach GC-Korrektur (voraussichtlich +- 0, nur zu Informationszwecken).
GC-Verzerrung von Testproben	GCBias	-0,5	0,5	Warnung	Test		Verbleibende GC-Verzerrung nach GC-Korrektur (voraussichtlich +- 0, nur zu Informationszwecken).
GC R2 von Kontrollproben	GC R2	0	0,9999	Warnung	Control		R ² im Zusammenhang mit der GC-Korrektur (nur zu Informationszwecken).
GC R2 von Testproben	GC R2	0	0,9999	Warnung	Test		R ² im Zusammenhang mit der GC-Korrektur (nur zu Informationszwecken).

Methodenvergleichsstudie

Methodenvergleichsdaten

Für diese Studie wurden zuvor vorbereitete Bibliotheken aus 105 Plasmaproben mithilfe der VeriSeq NIPT Analysis Software (16 Proben) resequenziert und verarbeitet. Diese Proben wurden vorher einem Verifi®-Testlauf unterzogen und in 7 Bibliotheken multiplexiert, die aus 14 maternalen Plasmaproben, 1 maternalen PoolPositivkontrollprobe sowie 1 Negativkontrolle (NTC) bestehen. [Tabelle 22](#) zeigt die Probenzusammensetzung der einzelnen Bibliotheken.

Alle 98 einzelnen Nichtkontrollproben haben die Qualitätssicherung durchlaufen und wurden auf Übereinstimmung mit den Verifi-Ergebnissen analysiert. Jede Probe wurde auf Grundlage der NCV-Werte für Trisomie 13/18/21 (mithilfe eines Grenzwerts von NCV = 4) nach Vorhandensein von Chromosom Y (mithilfe eines Grenzwerts von NCV = 10) und nach Monosomie X (mithilfe eines Grenzwerts von NCV_X = -4, bei Nichtvorhandensein von Chromosom Y) klassifiziert. Die Übereinstimmung insgesamt in Prozent zwischen VeriSeq NIPT und Verifi ist in [Tabelle 23](#) dargestellt.

Es wurden zwei Abweichungen beobachtet. Vom Verifi-Test wurde Chromosom 13 als Trisomie 13 klassifiziert, von der Veriseq NIPT Analysis Software (16 Proben) hingegen als negativ. Zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertete klinische Informationen zu dieser Probe belegten einen negativen Befund für Trisomie 13. Eine weitere Abweichung wurde für Trisomie 18 beobachtet. Für diese Probe standen keine Informationen auf Grundlage klinischer Ergebnisse zur Verfügung.

Tabelle 22 Verteilung von Proben über Bibliotheken hinweg

Bibliothek	Kontrolle	MX	T13	T18	T21	Nicht betroffen
01	1				2	12
02	1			1	1	12
03	1	1			1	12
04	1		1	1	1	11
05	1	1			1	12
06	1		1		1	12
07	1				1	13
Summe	7	2	2	2	8	84

Tabelle 23 Übereinstimmung insgesamt in Prozent zwischen VeriSeq NIPT und Verifi

	Gesamtübereinstimmung
Klasse 13	98,98 %
Klasse 18	98,98 %
Klasse 21	100 %
ChrY vorhanden/fehlt	100 %
Klasse Monosomie X	100 %

Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

Website: www.illumina.com
E-Mail: techsupport@illumina.com

Telefonnummern des Illumina-Kundendiensts

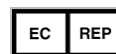
Region	Gebührenfrei	Regional
Nordamerika	+1.800.809.4566	
Australien	+1.800.775.688	
Belgien	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Dänemark	+45 80820183	+45 89871156
Deutschland	+49 8001014940	+49 8938035677
Finnland	+358 800918363	+358 974790110
Frankreich	+33 805102193	+33 170770446
Großbritannien	+44 8000126019	+44 2073057197
Hongkong	800960230	
Irland	+353 1800936608	+353 016950506
Italien	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Neuseeland	0800.451.650	
Niederlande	+31 8000222493	+31 207132960
Norwegen	+47 800 16836	+47 21939693
Österreich	+43 800006249	+43 19286540
Schweden	+46 850619671	+46 200883979
Schweiz	+41 565800000	+41 800200442
Singapur	+1.800.579.2745	
Spanien	+34 911899417	+34 800300143
Taiwan	00806651752	
Andere Länder	+44.1799.534000	

Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) sind auf der Illumina-Website unter support.illumina.com/sds.html verfügbar.

Die **Produktdokumentation** steht auf der Illumina-Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu support.illumina.com, wählen Sie ein Produkt und wählen Sie anschließend **Documentation & Literature** (Dokumentation und Literatur).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



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

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

illumina®