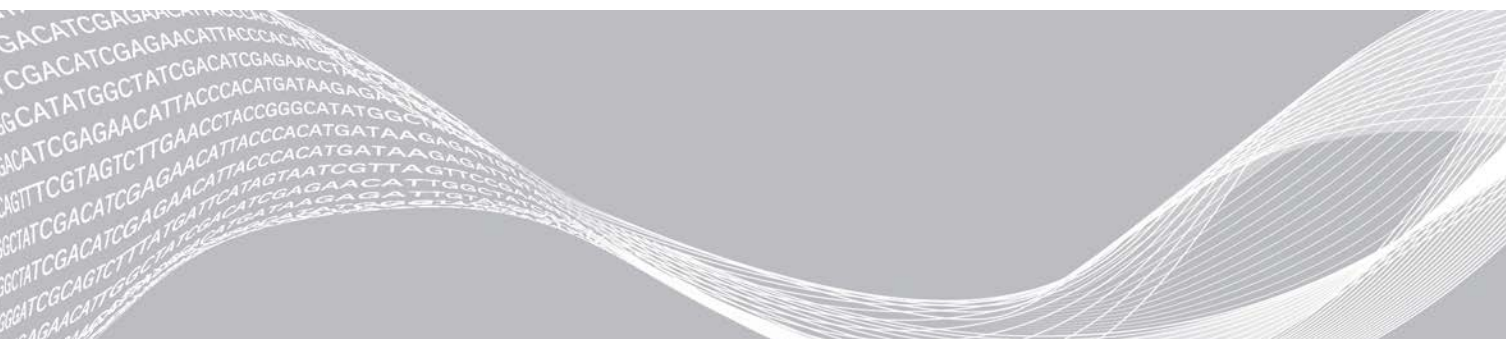


Modulo di analisi Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro

Guida al flusso di lavoro

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Panoramica	3
Immissione delle informazioni per la corsa	3
Metodi di analisi	5
Visualizzazione della corsa e dei risultati	5
File dei dati di monitoraggio dei lotti	6
Report dei risultati	6
Cronologia delle revisioni	9
Assistenza tecnica	10



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

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

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POTREBBERO CAUSARE DANNI AI PRODOTTI, LESIONI PERSONALI A UTENTI O TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AI PRODOTTI.

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

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Panoramica

Il modulo di analisi Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro è destinato all'uso con TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay in caso di elaborazione di 24-36 campioni. Il saggio rileva le mutazioni nelle regioni codificanti la proteina e i confini introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR, Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), incluse due ampie delezioni e due mutazioni introniche profonde. Il modulo di analisi esegue l'analisi secondaria e genera report con i dati ottenuti dalle corse di sequenziamento che utilizzano TruSight Cystic Fibrosis. Per maggiori informazioni su TruSight Cystic Fibrosis, consultare l'*inserto della confezione di TruSight Cystic Fibrosis (documento n. 1000000097720)*.

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

Informazioni sulla guida

La presente guida fornisce istruzioni per l'impostazione dei parametri di una corsa per il sequenziamento e l'analisi sul modulo di analisi CF Clinical Seq 2.0 Micro. L'utilizzo del software richiede la conoscenza di base dell'attuale sistema operativo Windows e dell'interfaccia utente basata sul browser web. Per informazioni sul pannello di controllo e sulle impostazioni di sistema di Local Run Manager, vedere la *Guida di consultazione del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 100000011880)*.

Immissione delle informazioni per la corsa

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Selezionare **Create Run** (Crea corsa), quindi **CF Clinical Seq 2.0 Micro**.
Viene visualizzata una finestra di conferma selezione.
- 3 Selezionare la casella di controllo, quindi **Confirm** (Conferma) per continuare oppure **Cancel** (Annulla) per tornare alla schermata principale.
- 4 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini o trattini bassi (massimo 40 caratteri).
- 5 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione della corsa.
Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini o trattini bassi (massimo 150 caratteri).
- 6 Immettere il numero di lotto e la data di scadenza per il kit di preparazione delle librerie.

Indicazione dei campioni per la corsa

Specificare i campioni per la corsa utilizzando una delle opzioni riportate di seguito.

- ▶ **Enter samples manually** (Immetti campioni manualmente): utilizzare la tabella vuota che si trova nella schermata Create Run (Crea corsa).
- ▶ **Import samples** (Importa campioni): individuare un file esterno nel formato *.csv (valori separati da virgola). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.

Immissione manuale dei campioni

- 1 Immettere un nome campione univoco nel campo Sample Name (Nome campione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi (massimo 40 caratteri).
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare i campioni di controllo positivi e negativi.
Per salvare una corsa, devono essere presenti almeno un controllo positivo e un controllo negativo.
- 3 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione del campione nella scheda Sample Description (Descrizione campione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi (massimo 50 caratteri).
- 4 **[Facoltativo]** Selezionare un adattatore indice 1 dall'elenco a discesa Index 1 (i7) (Indice 1 (i7)).
Il layout predefinito compila automaticamente le combinazioni di indici i7 e i5.
- 5 **[Facoltativo]** Selezionare un adattatore indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Indice 2 (i5)).
Il layout predefinito compila automaticamente le combinazioni di indici i7 e i5.
- 6 Selezionare l'icona **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 7 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 8 **[Facoltativo]** Selezionare **Export** (Esporta) per esportare il file contenente le informazioni sui campioni.
- 9 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).
Se sono stati immessi meno di 24 campioni, viene visualizzata la finestra Insufficient Sample (Campione insufficiente). Selezionare **Proceed** (Prosegui) per continuare oppure **Cancel** (Annulla) per modificare i campioni.
Se sono stati immessi più di 36 campioni, viene visualizzato un messaggio di errore e la corsa non viene salvata. Inserire un massimo di 36 campioni.



ATTENZIONE

Il sequenziamento con librerie raggruppate in pool contenenti meno di 24 campioni non è convalidato da Illumina. Per maggiori informazioni, vedere l'insero della confezione di TruSight Cystic Fibrosis (documento n. 1000000097720).

Importazione dei campioni

Le informazioni relative ai campioni possono essere importate da due tipi di file:

- ▶ Un file contenente le informazioni sui campioni precedentemente esportato dal modulo CF Clinical Seq 2.0 Micro tramite la funzione Export (Esporta).
- ▶ Un file modello, che può essere creato selezionando **Template** (Modello) nella schermata Create Run (Crea corsa). Il file modello contiene le intestazioni di colonna corrette per l'importazione e include informazioni segnaposto in ogni colonna. Per personalizzare il file modello, utilizzare un editor esterno come descritto di seguito.
 - 1 Aggiungere le informazioni relative a ogni campione della corsa.
 - 2 Dopo aver aggiunto tutte le informazioni relative ai campioni, eliminare le eventuali informazioni segnaposto rimaste nelle celle inutilizzate.
 - 3 Salvare il file modello.

Per importare le informazioni sui campioni:

- 1 Selezionare **Import Samples** (Importa campioni), quindi cercare il file e selezionarlo.
- 2 Selezionare l'icona **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 3 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 4 **[Facoltativo]** Selezionare **Export** (Esporta) per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno.
- 5 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).
Se sono stati immessi meno di 24 campioni, viene visualizzata la finestra Insufficient Sample (Campione insufficiente). Selezionare **Proceed** (Prosegui) per continuare oppure **Cancel** (Annulla) per modificare i campioni.
Se sono stati immessi più di 36 campioni, viene visualizzato un messaggio di errore e la corsa non viene salvata. Inserire un massimo di 36 campioni.



ATTENZIONE

Il sequenziamento con librerie raggruppate in pool che contengono meno di 24 campioni non è convalidato da Illumina. Consultare l'insero della confezione di TruSight Cystic Fibrosis (documento n. 1000000097720) per ulteriori informazioni.

Modifica di una corsa

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

Metodi di analisi

Per una descrizione dei metodi di analisi per TruSight Cystic Fibrosis, vedere *l'insero della confezione di TruSight Cystic Fibrosis* (documento n. 1000000097720).

Visualizzazione della corsa e dei risultati

- 1 Nella schermata principale di Local Run Manager, selezionare il nome della corsa.
- 2 Nella scheda Run Overview (Panoramica corsa), rivedere le metriche della corsa di sequenziamento.
- 3 **[Facoltativo]** Selezionare l'icona **Copy to Clipboard** (Copia negli appunti) per copiare il percorso della cartella di output della corsa.
- 4 Selezionare la scheda Sequencing Information (Informazioni sequenziamento) per rivedere i parametri della corsa e le informazioni relative ai materiali di consumo.
- 5 Selezionare la scheda Samples and Results (Campioni e risultati) per visualizzare i risultati dell'analisi. La scheda fornisce l'elenco dei campioni con il riepilogo circa percentuale di identificazione, prestazioni, coordinate non identificate e le informazioni sui campioni di controllo.
 - ▶ Se l'analisi è stata ripetuta, espandere l'elenco a discesa Select Analysis (Seleziona analisi).
 - ▶ Selezionare l'analisi appropriata.
- 6 **[Facoltativo]** Fare doppio clic nel campo Comment (Commento) per immettere un commento relativo a un campione dell'elenco. Selezionare **Save Changes** (Salva modifiche).
- 7 Selezionare i campioni nell'elenco per visualizzare le informazioni dettagliate sulle varianti. Le informazioni sulle varianti dei campioni vengono visualizzate sotto l'elenco dei campioni.

- 8 **[Facoltativo]** Fare doppio clic nel campo della colonna Interpretation (Interpretazione) per selezionare una delle opzioni seguenti:
 - ▶ **CF** (Cystic Fibrosis): che causa la fibrosi cistica
 - ▶ **MVCC** (Mutation of Varying Clinical Consequence): mutazione con conseguenze cliniche variabili
 - ▶ **MOUS** (Mutation of Unknown Significance): mutazione con significato sconosciuto
 - ▶ **NCFCM** (Non CF Causing Mutation): mutazione che non causa la fibrosi cistica
 - ▶ **Unknown (Sconosciuta)**
- 9 Selezionare **Save Changes** (Salva modifiche).

NOTA

Ogni volta che vengono salvate le modifiche, viene generato un file dei risultati dell'analisi nella cartella **Alignment** (Allineamento). Questo file include il timestamp aggiunto al nome del file nel formato **AAMMGG_HHMMSS**.

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

File dei dati di monitoraggio dei lotti

Al completamento dell'analisi, scegliere una delle opzioni seguenti per visualizzare il file **LotTracking.txt**.

- ▶ Nella scheda Samples and Results (Campioni e risultati), selezionare **Export Lot Tracking Data** (Esporta dati di monitoraggio dei lotti).
- ▶ Aprire il file contenuto nella cartella Alignment (Allineamento).
Il percorso della cartella Alignment (Allineamento) viene visualizzato nella scheda Samples and Results (Campioni e risultati) nel campo Analysis Folder (Cartella analisi).
 - ▶ **[Facoltativo]** Selezionare l'icona **Copy to Clipboard** (Copia negli appunti) per copiare il percorso della cartella di analisi.

Una volta completata l'analisi, il file dei dati di monitoraggio dei lotti viene scritto nella cartella Alignment (Allineamento) relativa alla corsa. Ad esempio: **MiSeqAnalysis\<Nome cartella corsa>\Alignment_N\AAMMGG_HHMMSS**. N è un numero sequenziale che aumenta quando l'analisi viene rimessa in coda. **AAMMGG_HHMMSS** è il timestamp della corsa.

Report dei risultati

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

Il file dei risultati dell'analisi include le informazioni della scheda Samples and Results (Campioni e risultati). Scegliere una delle seguenti opzioni per visualizzare il file dei risultati dell'analisi **TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt**:

- ▶ Nella scheda Samples and Results (Campioni e risultati), selezionare **Export Data** (Esporta dati).
- ▶ Aprire il file contenuto nella cartella Alignment (Allineamento).
Il percorso della cartella Alignment (Allineamento) viene visualizzato nella scheda Samples and Results (Campioni e risultati) nel campo Analysis Folder (Cartella analisi).

- Selezionare l'icona **Copy to Clipboard** (Copia negli appunti) per copiare il percorso della cartella di analisi.

I file di analisi per ogni corsa di sequenziamento sono memorizzati sullo strumento. I file vengono salvati in `MiSeqAnalysis\<Nome cartella corsa>\Data\Intensities\BaseCalls` e `MiSeqAnalysis\<Nome cartella corsa>\Alignment_N\AAMMGG_HHMMSS`. N è un numero sequenziale che aumenta quando l'analisi viene rimessa in coda. AAMMGG_HHMMSS è il timestamp della corsa.

Informazioni sul file dei risultati dell'analisi

Il file dei risultati dell'analisi `TruSightClinicalSequencingAssay.txt` include tre sezioni: l'intestazione del file, le informazioni sui campioni e le informazioni sulle varianti dei campioni. L'intestazione del file viene elencata per prima e include informazioni generali sulla corsa. Vi è una sola intestazione del file per corsa. Le informazioni sui campioni e le informazioni sulle varianti dei campioni sono incluse per ogni campione utilizzato nell'analisi. Queste sezioni vengono accoppiate per ogni campione.

La tabella seguente riporta la descrizione di ogni riga nell'intestazione del file, che include informazioni sulla corsa:

Tabella 1 Intestazione del file (informazioni sulla corsa)

Intestazione della riga	Descrizione
Test	Descrive il test eseguito.
Run ID (ID corsa)	ID della corsa generato da MCS all'inizio della corsa di sequenziamento.
Run Date (Data corsa)	Data (AAMMGG) in cui la corsa di sequenziamento ha avuto inizio in MOS.
Analysis Version (Versione analisi)	Versione del software utilizzato per l'analisi.

La tabella seguente fornisce una descrizione di tutte le righe contenute nelle sezioni delle informazioni sui campioni:

Tabella 2 Informazioni sui campioni

Intestazione della riga	Descrizione
Sample ID (ID campione)	Nome del campione fornito al momento della creazione della corsa, assieme all'ID dell'analisi assegnato dal software Local Run Manager. Se una corsa viene rimessa in coda, la parte dell'ID campione che corrisponde al nome del campione rimane invariata, mentre viene modificato l'ID dell'analisi. Questo campo si trova solo nel file *.txt.
Sample Name (Nome campione)	Nome del campione fornito al momento della creazione della corsa.
Control (Controllo)	Tipo di campione di controllo fornito al momento della creazione della corsa. I valori sono positivi o negativi. Un campo vuoto indica solo il campione.
Comment (Commento)	Campo di testo facoltativo per i commenti. I commenti della corsa di un'analisi precedente non vengono riportati nella corsa dell'analisi successiva.
Performance (Prestazioni)	Frequenza di Pass (Superato) o Fail (Non superato) in base alla percentuale di identificazione. Per un campione di controllo positivo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato) con una percentuale di identificazione superiore o uguale al 99% • FAIL (Non superato) con una percentuale di identificazione inferiore al 99% Per un campione di controllo negativo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato) con una percentuale di identificazione inferiore o uguale al 10% • FAIL (Non superato) con una percentuale di identificazione superiore al 10% Per un campione non indicato come controllo positivo o negativo: <ul style="list-style-type: none"> • PASS (Superato) con una percentuale di identificazione superiore o uguale al 99% • FAIL (Non superato) con una percentuale di identificazione inferiore al 99%

Intestazione della riga	Descrizione
Sample Call Rate (Percentuale di identificazione dei campioni)	Numero di posizioni delle varianti che soddisfano un valore di soglia di affidabilità predefinito diviso per il numero totale di posizioni delle varianti interrogate. La percentuale di identificazione viene descritta in base al singolo campione e riportata sotto forma di percentuale calcolata come 1 meno [numero di posizioni delle varianti con identificazioni incomplete diviso per il numero totale di posizioni delle varianti sequenziate].

La tabella seguente riporta la descrizione di ogni colonna presente nelle sezioni delle varianti dei campioni:

Tabella 3 Informazioni sulle varianti dei campioni

Intestazione di colonna	Descrizione
Variant Type (Tipo di variante)	Tipo di variante. <ul style="list-style-type: none"> • SNV (Single Nucleotide Variant): variante a singolo nucleotide • DIV (Deletion Insertion Variant): variante inserzione delezione • DEL: ampia delezione • PolyTGPolyT: genotipo PolyTG/PolyT nel gene CF
Coordinate (Coordinata)	Posizione del genoma in cui è stata trovata la variante.
Chromosome (Cromosoma)	ID del cromosoma di riferimento.
Frequency (Frequenza)	Frazione di letture per il campione che include la variante. Per esempio, se la base di riferimento in una determinata posizione è A e il campione 1 ha 60 letture A e 40 letture T, la SNV ha una frequenza di variante pari a 0,4.
Depth (Profondità)	Numero di letture per un campione che copre una determinata posizione.
cDNA Name (HGVS) (Nome cDNA (HGVS))	Descrizione di una variante a livello di DNA mediante la nomenclatura della sequenza di DNA codificante (cDNA) raccomandata dalla Human Genome Variation Society (HGVS).
Protein Name (HGVS) (Nome proteina (HGVS))	Descrizione di una variante a livello di proteina mediante la nomenclatura della sequenza proteica raccomandata dalla Human Genome Variation Society (HGVS).
dbSNP ID (ID dbSNP)	ID dbSNP della variante.
Reference (Riferimento)	Base di riferimento in corrispondenza della coordinata genomica indicante il punto di rilevamento della variante. Questo campo si trova nel file *.txt.
Result (Risultato)	Genotipo della variante. <ul style="list-style-type: none"> • SNV o DIV: descrizione dei due alleli osservati. Ad esempio, A/T descrive una SNV in cui sono stati osservati entrambi gli alleli A e T e che è eterozigote. L'allele wild type viene elencato per primo, seguito dall'allele della variante. • Small Deletions (Delezioni piccole): l'allele della variante descrive l'allele con la delezione. Ad esempio, ATCT/A. • Insertions (Inserzioni): l'allele della variante descrive l'allele con l'inserzione. Ad esempio, C/CT. • DEL: il risultato viene riportato come Het Deletion (Delezione eterozigote) o Hom Deletion (Delezione omozigote). • PolyTGPolyT: indicazione dell'effettivo genotipo.
Interpretation (Interpretazione)	Questo campo consente al genetista di fornire un'interpretazione clinica della mutazione di ogni campione. <ul style="list-style-type: none"> • CF (Cystic Fibrosis): che causa la fibrosi cistica • MVCC (Mutation of Varying Clinical Consequence): mutazione con conseguenze cliniche variabili • MOUS (Mutation of Unknown Significance): mutazione con significato sconosciuto • NCFM (Non CF Causing Mutation): mutazione che non causa la fibrosi cistica • Unknown (Sconosciuta)

La sezione Sample Variants Information (Informazioni sulle varianti dei campioni) include anche una voce `Coordinates Not Called` (Coordinate non identificate), nella quale vengono elencate le coordinate genomiche nella regione di interesse in cui non è stata riportata un'identificazione a causa di bassi valori di affidabilità.

Cronologia delle revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 200017945 v00	Maggio 2022	Versione iniziale.

Assistenza tecnica

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

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

Numeri di telefono dell'assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero verde	Per area geografica
Nord America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	400.066.5835	
Corea del Sud	+82 80 234 5300	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940	+49 8938035677
Giappone	0800.111.5011	
Hong Kong, Cina	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Norvegia	+47 800 16836	+47 21939693
Nuova Zelanda	0800.451.650	
Paesi Bassi	+31 8000222493	+31 207132960
Regno Unito	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapore	+1.800.579.2745	
Spagna	+34 911899417	+34 800300143
Svezia	+46 850619671	+46 200883979
Svizzera	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, Cina	00806651752	
Altri paesi	+44.1799.534000	

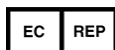
Schede dei dati di sicurezza (SDS, Safety Data Sheet): disponibili sul sito web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione sui prodotti: disponibile per il download all'indirizzo support.illumina.com.



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

CE



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Paesi Bassi

Sponsor australiano

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

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®