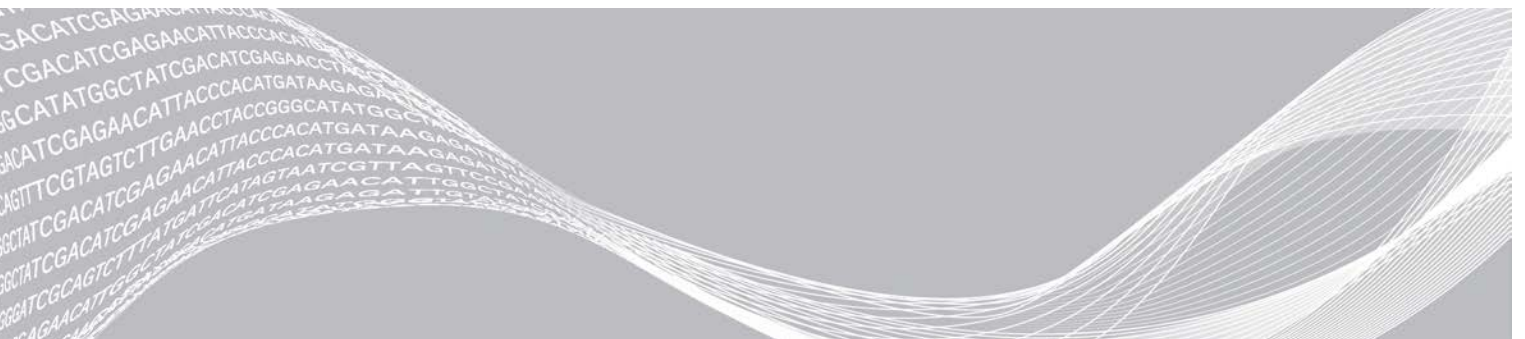


VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni)

Guida per l'utente



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

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

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IN CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

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

© 2020 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.

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 1000000012693 v05	Aprile 2020	Aggiornati gli indirizzi dei rappresentanti autorizzati nell'Unione Europea.
Documento n. 1000000012693 v04	Luglio 2018	Aggiunti Limiti della procedura e Appendice B Studio sul confronto dei metodi.
Documento n. 1000000012693 v03	Gennaio 2017	<ul style="list-style-type: none"> Frazione fetale stimata: aggiunto ulteriore chiarimento relativo alla frazione fetale stimata. Tabella 4 Notifiche di cambiamento dello stato normale e azioni richieste: aggiunta una nota ad Esempio di contenuto di notifica e-mail per Invalid Sample IDs found in the Sample Sheet (Nel foglio campioni sono stati identificati ID campioni non validi). Specifiche del foglio campioni e regole di convalida: sostituito il contenuto della seconda nota. Tabella 8 Regole di convalida del foglio campioni per NGS Opzione 1 (sezione dati): aggiunto "Sample ID (ID campione) non può contenere spazi. Evitare di combinare trattini bassi e trattini adiacenti e multipli. A partire dalla versione 1.4, Sample_ID (ID_campione) non può iniziare con 0 (zero)." a Validation Rules (Regole di convalida) nella riga Sample ID (ID campione). Tabella 11 Regole di convalida del foglio campioni per NGS Opzione 2 (sezione dati): aggiunto "Sample ID (ID campione) non può contenere spazi. Evitare di combinare trattini bassi e trattini adiacenti e multipli. A partire dalla versione 1.4, Sample_ID (ID_campione) non può iniziare con 0 (zero)." a Validation Rules (Regole di convalida) nella riga Sample ID (ID campione).
Documento n. 1000000012693 v02	Agosto 2016	Aggiornato il contenuto per la release v1.4
Documento n. 1000000012693 v01	Giugno 2016	Aggiornato quanto segue: <ul style="list-style-type: none"> Indirizzo del rappresentante autorizzato europeo e i marchi CE e IVD sulla quarta di copertina. Descrizione generale del sistema Regole di convalida per Sample_ID (ID campione) La sezione Rimessa in coda dell'analisi per chiarezza e per fornire informazioni sulla risoluzione dei problemi
Documento n. 1000000012693 v00	Aprile 2016	Versione iniziale.

Sommario

Capitolo 1 Descrizione generale	1
Descrizione generale del sistema	1
Concetti di VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni)	2
Capitolo 2 Funzionamento del sistema	5
Login	5
Organizzazione dei dati	5
Compatibilità della corsa di sequenziamento	6
Requisiti di timeout e di archiviazione del flusso di lavoro	7
Flusso dei dati del sistema	7
Spegnimento dello strumento	23
Capitolo 3 Analisi e creazione di report	24
Specifiche del foglio campioni e regole di convalida	24
Demultiplex e generazione di file in formato FASTQ	35
Rimessa in coda di un'analisi	36
Archiviazione e backup dei dati	38
Specifiche del report e interpretazione delle metriche	39
Verifica dell'esecuzione di ATMS	42
Appendice A Metriche di controllo qualità (QC)	43
Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 1)	44
Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 2)	50
Appendice B Studio sul confronto dei metodi	57
Dati sul confronto dei metodi	57
Assistenza Tecnica	58

Descrizione generale

Descrizione generale del sistema	1
Concetti di VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni)	2

Descrizione generale del sistema

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) è preinstallato in VeriSeq NIPT Analysis Server (16 campioni), numero codice Illumina RH-400-1001. Il server e il software preinstallati forniscono:

- ▶ Un server analitico con una capacità sufficiente per l'analisi dei dati di sequenziamento generati da due strumenti di sequenziamento di nuova generazione (NGS). Le opzioni per i due strumenti NGS sono:
 - ▶ Un sequenziatore a due celle a flusso che utilizza una cella a flusso a due corsie (NGS Opzione 1).
 - ▶ Un sequenziatore a singola cella a flusso che utilizza una cella a flusso a quattro corsie (NGS Opzione 2).
- ▶ Una serie di software in grado di analizzare i dati di sequenziamento in formato BCL generati dal software di sequenziamento, ottenuti da librerie preparate in base ai protocolli di sequenziamento cfDNA per rilevare aneuploidie fetali in base alla rappresentazione cromosomica. La serie di software contiene due componenti:
 - ▶ **Analysis Task Manager Service (ATMS):** un servizio in secondo piano (daemon) che:
 - ▶ Monitora i percorsi degli output per individuare nuove cartelle della corsa.
 - ▶ Analizza i metadati sulle corse per confrontare la configurazione dei parametri della corsa di sequenziamento con un set di flussi di lavoro analitici preconfigurati.
 - ▶ Carica il foglio campioni associato con ciascuna corsa di sequenziamento, mappando le identità di campioni singoli sugli indici su una data cella a flusso.
 - ▶ Prepara gli input per il gruppo di software analitici.
 - ▶ Esegue il gruppo di software.
 - ▶ Tiene traccia di tutti i dati degli input e degli output in un database.
 - ▶ Genera un report della corsa per ciascun singolo campione su una cella a flusso.
 - ▶ **cADAS:** una serie di software analitici per rilevare le aneuploidie fetali da dati di sequenziamento generati da cfDNA isolato da plasma materno.
 - ▶ Analizza i dati di sequenziamento elaborandoli mediante allineamento, calcolo della copertura, normalizzazione dei dati e riepilogo per cromosoma.
 - ▶ Genera le metriche di controllo qualità (QC) e uno stato di superato, non superato o avvertenza per ogni campione.
 - ▶ Genera un punteggio che caratterizza il materiale cromosomico come sovrarappresentato o sottorappresentato per ciascuno dei cromosomi target.



NOTA

Il numero massimo consentito di campioni non riusciti in un singolo batch è 4. Non elaborare i batch fino all'analisi se presentano meno di 11 campioni validi.

Uso previsto

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) genera punteggi quantitativi per contribuire al rilevamento e alla differenziazione dello stato delle aneuploidie fetali per i cromosomi 21, 18, 13, X e Y analizzando i dati di sequenziamento generati dai frammenti di DNA libero fetale (cfDNA) isolato da campioni di sangue intero periferico materno in donne in gravidanza ad almeno 10 settimane di gestazione.

I punteggi quantitativi sono associati ai punteggi z con rappresentazione superiore o inferiore di un cromosoma target relativo a un valore previsto per un genoma diploide.

Limiti della procedura

- ▶ VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) è progettato per l'utilizzo come parte di un test di screening e non deve essere preso in considerazione indipendentemente da altri risultati clinici e risultati di test. I cutoff definiti dall'utente applicati agli output dei dati di questo software devono prendere in considerazione gli effettivi vantaggi dell'aumento della sensibilità a costo della specificità e vice versa. Nessun singolo cutoff raggiunge contemporaneamente il 100% di sensibilità e il 100% di specificità. Sebbene accada di raro, i campioni elaborati a una profondità di sequenziamento con un valore FF relativamente basso, possono presentare output di dati prossimi alla soglia e un'accuratezza più bassa.
- ▶ I dati degli output di VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) sono utilizzati per creare report su quanto segue:
 - ▶ Sovrarappresentazione del cromosoma 21, 18 e 13
 - ▶ Le seguenti aneuploidie cromosomiche sessuali: XO, XXX, XXY e XYY
- ▶ VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) non è previsto per la creazione di report sulle poliploidie:
- ▶ Gli algoritmi utilizzati in VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) possono essere confusi da determinati fattori materni e fatali inclusi, ma non limitati, a quanto segue:
 - ▶ Recente trasfusione di sangue materno
 - ▶ Trapianto di organo materno
 - ▶ Procedura chirurgica materna
 - ▶ Immunoterapia o terapia con cellule staminali materna
 - ▶ Tumore maligno materno
 - ▶ Mosaicismo materno
 - ▶ Mosaicismo confinato alla placenta
 - ▶ Morte fetale
 - ▶ Gemello scomparso
 - ▶ Trisomia parziale o monosomia parziale fetale
 - ▶ Mosaicismo fetale

Concetti di VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni)

I concetti e termini seguenti sono solitamente usati in VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni).

Concetto	Descrizione
cADAS	Il gruppo di software di analisi. Un'applicazione lato server utilizzata per l'analisi dei dati di sequenziamento e il rilevamento di aneuploidie.
cfDNA	Il DNA libero fetale è il DNA sia materno che di origine fetale che circola liberamente nel flusso sanguigno della madre. L'analisi del cfDNA fornisce un metodo di test prenatale non invasivo.
Cartella delle corse	La struttura della cartella generata dallo strumento di sequenziamento NGS e popolata dal software di analisi primaria dei dati Real-Time Analysis (RTA).

Concetto	Descrizione
Foglio campioni	Un file *.csv (comma separated values, valori separati da virgola) che contiene le informazioni necessarie per impostare e analizzare una corsa di sequenziamento, compreso un elenco dei campioni e le relative sequenze d'indice.
Flusso di lavoro	Un processo analitico per analizzare le corse di sequenziamento eseguite da VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni). Il flusso di lavoro per ciascuna corsa è specificato nel foglio campioni.

Panoramica del software di analisi

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) valuta il numero di copie dei cromosomi testati nei campioni sperimentali. L'input di analisi sono letture a 36 basi generate da uno strumento di sequenziamento di nuova generazione. Le letture sono allineate sul genoma umano intero. Sole le letture che si allineano a una posizione o a un sito univoco nel genoma sono utilizzate per analisi ulteriore. Le letture duplicate sono rimosse dall'analisi. Le letture sono filtrate ulteriormente per escludere i siti associati con elevata variazione nella copertura su campioni euploidi. La copertura non elaborata viene regolata mediante la normalizzazione del contenuto GC e altri fattori a livello sottocromosomico e quindi riepilogata in copertura cromosomica da una media robusta di copertura lungo il cromosoma.

I cromosomi testati includono 21, 18 e 13, X e Y. La copertura normalizzata sui cromosomi testati viene normalizzata sui cromosomi di riferimento (denominatore) predefiniti per creare un rapporto cromosomico (R) del test. I cromosomi denominatori predefiniti sono ottimizzati per ridurre al massimo la variazione nei rapporti cromosomici per campioni euploidi. I rapporti cromosomici per testare i campioni sono convertiti in valori cromosomici normalizzati (Normalized Chromosomal Value, NCV) utilizzando una correzione su una media del rapporto regolato sulla cella a flusso e rapportato su scala mediante una variazione prevista predefinita nei campioni euploidi normali (stimata dai dati della formazione).

Figura 1 Esempio di rapporto cromosomico del test (R)

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

Il valore cromosomico normalizzato (NCV) viene determinato in base all'equazione mostrata nella [Figura 2](#). Il valore NCV è equivalente a un punteggio z. Un punteggio z descrive la differenza tra un valore e la media della popolazione in termini di deviazione standard. La soglia per identificare un campione come affetto o non affetto in base al valore NCV è determinata dai clienti prima della convalida clinica del flusso di lavoro e può essere regolata in base ai risultati dello studio di convalida clinica.

Figura 2 Valore cromosomico normalizzato (NCV)

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

i - cromosoma

k - campione

U - campione non affetto

R_{ik} - rapporto del cromosoma *i* nel campione k^{th}

$\overline{R_{Uj}}$ - rapporto cromosomico medio regolato sulla cella a flusso

σ_{Uj} - deviazione standard per il rapporto del cromosoma *i* nei campioni non affetti dal set di dati di formazione

Stima della frazione fetale

Con il termine frazione fetale si indica la percentuale di cellule libere, il DNA libero fetale circolante in un campione di sangue materno derivato dalla placenta. VeriSeq NIPT Analysis Software calcola la frazione fetale stimata in base alle differenze nella copertura genomica tra cfDNA materno e fetale.¹

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) utilizza le statistiche generate durante il sequenziamento per fornire una stima della frazione fetale (Fetal Fraction Estimation, FFE) per ciascun campione. Il valore FFE rappresenta il componente di cfDNA fetale stimato ottenuto dal saggio e riportato come percentuale arrotondata per ciascun campione. La deviazione media standard di questa stima su tutti i campioni è del 2%. Il valore FFE non deve essere utilizzato nell'isolamento per escludere i campioni quando vengono riportati i risultati.

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

Funzionamento del sistema

Login	5
Organizzazione dei dati	5
Compatibilità della corsa di sequenziamento	6
Requisiti di timeout e di archiviazione del flusso di lavoro	7
Flusso dei dati del sistema	7
Spegnimento dello strumento	23

Login

Il server analitico è impostato come una macchina Linux CentOS 6.6 con un account sbsuser.

Il login al server non fa parte del funzionamento normale. È richiesto solo per avviare il reboot e lo spegnimento.

Accedere al server utilizzando un terminale o una connessione ssh con le credenziali iniziali preimpostate:

- ▶ **User Name (Nome utente):** sbsuser
- ▶ **Password (Password):** per ottenere la password inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.
- ▶ **Group (Gruppo):** sbsuser

Organizzazione dei dati

Il server analitico dispone di un'impostazione del servizio di condivisione della rete che permette l'accesso al disco rigido dai sistemi Windows mediante un protocollo di condivisione samba. Il nome utente e la password iniziale preimpostati per le condivisioni samba sono 'sbsuser' e 'sbs123'. La condivisione del disco per questo account utente mediante il protocollo samba permette l'accesso alle condivisioni seguenti:

Posizione sul server Linux	Nome condivisione	Nome utente	Password iniziale	Diritti di accesso
/data01/runs	runs (corse)	sbsuser	Per ottenere la password inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.	Lettura/scrittura
/data01/analysis_output	analysis_output (output di analisi)	sbsuser	Per ottenere la password inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.	Lettura

Durante l'impostazione di una corsa di sequenziamento, impostare gli output nella directory runs (corse). Andare a \\<INDIRIZZO.IP.SERVER>\runs mediante le schermate per l'impostazione della corsa del software di controllo dello strumento di sequenziamento, dove <INDIRIZZO.IP.SERVER> rappresenta l'indirizzo IP di Onsite Server.

La directory analysis_output (output di analisi) contiene i report per tutte le celle a flusso elaborate mediante il flusso di lavoro analitico di cfDNA. Il sistema organizza i report in base al nome della cartella originaria della corsa generato dal software di sequenziamento, a cui aggiunge la data e l'ora dell'analisi.

Ad esempio, l'analisi della corsa 140806_SN7001227_0199_AHABHTADXX genera una cartella di output denominata 140806_SN7001227_0199_AHABHTADXX_140806_230337.

Utilizzare il formato del nome predefinito per la cartella della corsa fornito dal sistema di sequenziamento. VeriSeq NIPT Analysis Software richiede che il nome della cartella della corsa contenga solo i caratteri alfanumerici seguenti: a-z, A-Z, 0-9 e trattini bassi ("_"). Non sono consentiti spazi o altri caratteri.

Compatibilità della corsa di sequenziamento

Il server analizza solo le corse di sequenziamento compatibili con il flusso di lavoro analitico di cfDNA. Configurare il sequenziamento utilizzando parametri di letture compatibili.

Per NGS Opzione 1:

- ▶ **Read 1 (Lettura 1):** 36 basi
- ▶ **Index 1 (i7) (Indice 1 - i7):** 7 basi

Per NGS Opzione 2:

- ▶ **Read 1 (Lettura 1):** 36 basi
- ▶ **Index 1 (i7) (Indice 1 - i7):** 6 basi

Per generare identificazioni delle basi, utilizzare solo metodi di sequenziamento e versioni software compatibili.



NOTA

Monitorare regolarmente le metriche delle prestazioni dei dati di sequenziamento per assicurarsi che la qualità dei dati rientri nelle specifiche.

Tabella 1 Metodi di sequenziamento e versioni software compatibili per NGS Opzione 1

Parametro	Valore compatibile
SBS (SBS)	TruSeq Rapid SBS Kit TruSeq Rapid SBS Kit v1 o HiSeq Rapid SBS Kit v2
Index (Indice)	TruSeq Rapid SR Cluster Kit TruSeq Rapid SR Cluster Kit v1 o HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2
Clustering Choice (Scelta cluster)	OnBoardClustering (Cluster sullo strumento)
Application Name (Nome applicazione)	HiSeq Control Software
Application Version (Versione applicazione)	2.0.12 o 2.2.38 o 2.2.58
FPGA Version (Versione FPGA)	3.10.3 o 7.7.2.5 o 7.9.7
RTA Version (Versione RTA)	1.17.21 o 1.18.61 o 1.18.64

Tabella 2 Metodi di sequenziamento e versioni software compatibili per NGS Opzione 2

Parametro	Valore compatibile
Application Name (Nome applicazione)	NextSeq Control Software
Application Version (Versione applicazione)	1.3.0 o 2.0.0 o 2.1.0
RTA Version (Versione RTA)	2.1.3 o 2.4.6 o 2.4.11

Requisiti di timeout e di archiviazione del flusso di lavoro

Il flusso di lavoro analitico di cfDNA è soggetto alle limitazioni seguenti per timeout e archiviazione.

Tabella 3 Requisiti di timeout e di archiviazione del flusso di lavoro

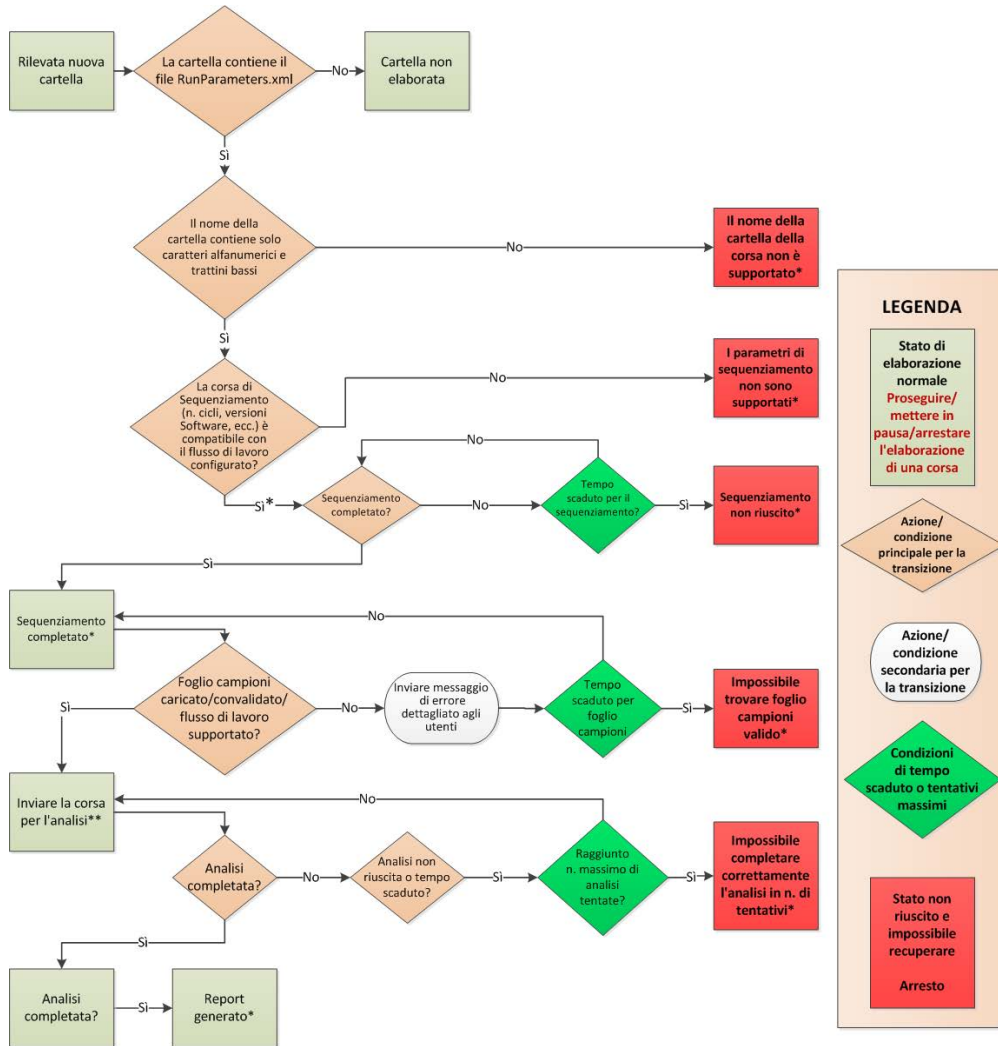
Parametro	Valore predefinito
Maximum Run Parameters Wait Time (Tempo di attesa massimo per i parametri della corsa)	4 ore
Maximum Sequencing Time (Durata massima del sequenziamento)	20 ore
Maximum Sample Sheet Wait Time (Tempo di attesa massimo per il foglio campioni)	96 ore
Maximum Analysis Time (Durata massima dell'analisi)	3,5 ore
Minimum Scratch Space Storage (Spazio di archiviazione minimo a disposizione)	200 GB

Flusso dei dati del sistema

In condizioni normali, ATMS invia agli utenti notifiche sullo stato della corsa di sequenziamento e sull'analisi mediante un sistema e-mail. La [Figura 3](#) mostra il flusso dei dati nel sistema e gli stati con le notifiche e-mail associate.

- ▶ **Rettangoli grigi:** stati di elaborazione normali
- ▶ **Rombi:** condizioni primarie per passare allo stato successivo
- ▶ **Ovali:** condizioni secondarie per passare allo stato successivo
- ▶ **Rettangoli rossi:** stati di errore

Figura 3 Diagramma del flusso dei dati



* Il sistema genera notifiche e-mail.

** Se sul server non è disponibile spazio di archiviazione adeguato, il sistema genera una notifica e-mail.

Durante l'elaborazione normale, **ATMS**:

- ▶ Monitora la directory predefinita (/data01/runs) per verificare la presenza di nuove corse di sequenziamento. Le nuove corse di sequenziamento sono definite come cartelle contenenti un file runParameters.xml [NGS Opzione 1] o un file RunParameters.xml [NGS Opzione 2].
- ▶ Verifica la compatibilità dei parametri della corsa di sequenziamento con flussi di lavoro di analisi predefiniti.
- ▶ Carica il foglio campioni.
- ▶ Programma ed esegue l'elaborazione analitica per generare report finali.

L'analisi viene eseguita su una cella a flusso alla volta. Le ulteriori celle a flusso che attendono di essere analizzate sono messe in coda sul server e vengono analizzate nell'ordine in cui sono state caricate.

Notifiche di sistema

Il sistema invia notifiche e-mail agli individui o ai gruppi di distribuzione e-mail impostati durante la procedura di installazione del server. Illumina raccomanda di utilizzare gruppi di distribuzione e-mail, che l'amministratore delle e-mail può modificare. Se il server è configurato utilizzando indirizzi individuali, la configurazione delle e-mail per il server di analisi richiede modifiche in caso di cambio di utente. Le notifiche e-mail indicano lo stato durante il normale funzionamento e allertano l'utente in caso di errori generati durante l'analisi.

La [Tabella 4](#) descrive le diverse notifiche e-mail inviate dal sistema. Le convenzioni per la denominazione contenute nella tabella sono richieste da VeriSeq NIPT Analysis Software per importare i file di output NGS.



NOTA

Assicurarsi che le impostazioni delle e-mail indesiderate (spam) permettano le notifiche e-mail provenienti dal server. Le notifiche e-mail sono inviate da un account denominato `atms@<dominio e-mail del cliente>`, dove `<dominio e-mail del cliente>` è specificato dal team IT locale al momento dell'installazione del server.

Tabella 4 Notifiche di cambiamento dello stato normale e azioni richieste

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
<p>Il sequenziamento è stato avviato. Questa notifica viene inviata quando il server rileva una nuova cartella della corsa. La cartella della corsa contiene il file dei parametri della corsa, indicante che il sequenziamento è stato avviato con i parametri di sequenziamento appropriati. Nome del file dei parametri della corsa: [NGS Opzione 1] runParameters.xml [NGS Opzione 2] RunParameters.xml</p>	Funzionamento normale	<p>Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX) Sequencing Run Status: Sequencing started (Stato della corsa di sequenziamento: sequenziamento avviato) Sequencing Start Time: 2014-05-12 08:15 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 2014-05-12 08:15 PDT) Sequencing Complete Time: NA (Ora di completamento del sequenziamento: ND) Workflow Name: NA (Nome del flusso di lavoro: ND) Analysis Scheduled Time: NA (Ora programmata per l'analisi: ND) Analysis Start Time: NA (Ora di avvio dell'analisi: ND) Analysis Finish Time: NA (Ora di termine dell'analisi: ND) Analysis Output Directory: NA (Directory degli output dell'analisi: ND)</p>
<p>La corsa di sequenziamento è stata completata.</p>	Funzionamento normale	<p>Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX) Sequencing Run Status: Sequencing completed (Stato della corsa di sequenziamento: sequenziamento completato) Sequencing Start Time: 2014-05-12 08:15 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 2014-05-12 08:15 PDT) Sequencing Complete Time: 2014-05-12 08:16 PDT (Ora di completamento del sequenziamento: 2014- 05-12 08:16 PDT) Workflow Name: NA (Nome del flusso di lavoro: ND) Analysis Scheduled Time: NA (Ora programmata per l'analisi: ND) Analysis Start Time: NA (Ora di avvio dell'analisi: ND) Analysis Finish Time: NA (Ora di termine dell'analisi: ND) Analysis Output Directory: NA (Directory degli output dell'analisi: ND)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
I parametri della corsa di sequenziamento non sono supportati.	Errore (non recuperabile)	<p>Sequencing run parameters for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' are not supported by any of the configured workflows. (I parametri della corsa di sequenziamento per la corsa di sequenziamento "140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX" non sono supportati da nessun flusso di lavoro configurato.)</p> <p>This sequencing run folder will not be processed further. (Questa cartella della corsa di sequenziamento non verrà ulteriormente elaborata.) See the following errors: (Vedere gli errori seguenti):</p> <p>Workflow Name: (Nome flusso di lavoro:)</p> <p>[NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 (Nome flusso di lavoro: [NGS Opzione 1] cfDNAHiSeqv1.0)</p> <p>[NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 ([NGS Opzione 2] cfDNANextSeqv1.0)</p> <p>Mismatching Sequence Run Parameters found: NumCycles2, NumIndexed2 (Individuati parametri della corsa di sequenziamento non corrispondenti: NumCycles2, NumIndexed2) Found NumCycles2 value: 10, expected value: 7 (Individuato valore NumCycles2: 10, valore previsto: 7) Found NumIndexed2 value: 10, expected value: 7 (Individuato valore NumIndexed2: 10, valore previsto: 7)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
È stato trovato un codice a barre della cella a flusso errato nel foglio campioni.	Avvertenza (recuperabile in 96 ore)	<p>The sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' found in the sequencing run folder generated the following error: (Il foglio campioni per la corsa di sequenziamento "140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX" individuato nella cartella della corsa di sequenziamento ha generato l'errore seguente:)</p> <p>The flow cell ID (barcode) recorded in the sample sheet ('Experiment Name' slot) is ''. (L'ID (codice a barre) della cella a flusso contenuto nel foglio campioni (Experiment Name - Nome esperimento) è ''.)</p> <p>This barcode is required to be identical to the barcode associated with the run folder 'H8HT6ADXX'. (Questo codice a barre deve essere identico al codice a barre associato con la cartella della corsa "H8HT6ADXX".)</p> <p>Please correct the error in order to proceed with analysis. (Correggere l'errore per poter proseguire con l'analisi.)</p> <p>The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Il foglio campioni verrà caricato nuovamente in circa 1 minuto.)</p> <p>The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Il foglio campioni si trova nella cartella della corsa '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
<p>Il flusso di lavoro indicato nella riga dell'intestazione Description (Descrizione) del foglio campioni non è supportato.</p>	<p>Avvertenza (recuperabile in 96 ore)</p>	<p>The sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' found in the sequencing run folder generated the following error: (Il foglio campioni per la corsa di sequenziamento "140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX" individuato nella cartella della corsa di sequenziamento ha generato l'errore seguente:) The workflow indicated in the sample sheet 'NIPT template1' is not supported by any of the configured workflows. (Il flusso di lavoro indicato nel foglio campioni "NIPT template1" non è supportato da nessun flusso di lavoro configurato.) The supported workflow names are: (I nomi dei flussi di lavoro configurati sono:) [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 (Nome flusso di lavoro: [NGS Opzione 1] cfDNAHiSeqv1.0) [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 ([NGS Opzione 2] cfDNANextSeqv1.0) Please correct the error in order to proceed with analysis. (Correggere l'errore per poter proseguire con l'analisi.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Il foglio campioni verrà caricato nuovamente in circa 1 minuto.) The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Il foglio campioni si trova nella cartella della corsa '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
Il file SampleSheet.csv non è presente nella cartella della corsa di sequenziamento.	Avvertenza (recuperabile in 96 ore)	<p>The sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' in the sequencing run folder generated the following error: (Il foglio campioni per la corsa di sequenziamento '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' individuato nella cartella della corsa di sequenziamento ha generato l'errore seguente:)</p> <pre>'/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX/SampleSheet.csv (No such file or directory)'. ('/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX/SampleSheet.csv (Non esiste tale file o directory)').</pre> <p>Please correct the error in order to proceed with analysis. (Correggere l'errore per poter proseguire con l'analisi.)</p> <p>The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Il foglio campioni verrà caricato nuovamente in circa 1 minuto.)</p> <p>The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Il foglio campioni si trova nella cartella della corsa '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
Nel foglio campioni sono stati identificati ID campioni non validi	Errore (recuperabile correggendo gli ID campioni)	<p>Parsing the sample sheet for sequencing run '160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX' in the sequencing run folder generated the following error(s): Error: Invalid Sample IDs found (contain characters other than alpha-numeric / dashes / underscores). (Durante il parsing del foglio campioni per la corsa di sequenziamento '160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX' nella cartella della corsa di sequenziamento sono stati generati gli errori seguenti: Errore: Individuati ID campioni non validi (contengono caratteri che non sono alfanumerici/trattini/trattini bassi).) Invalid Sample ID values are: Plasma Control. (Valori per ID campione non validi: Plasma Control (Controllo plasma).) Correct the error to proceed with analysis. (Correggere l'errore per procedere con l'analisi.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1.0 minutes. (Il foglio campioni verrà caricato di nuovo in circa 1 minuto.)</p> <p>Sample sheet should be located in the run folder '/data01/runs/160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX'. (Il foglio campioni dovrebbe essere posizionato nella cartella della corsa '/data01/runs/160217_NS500208_0021_AHK5NKBGXX'.)</p> <p>Note: This error is generated if any invalid characters, including spaces, are included in the sample sheet. (Nota: questo errore viene generato se qualsiasi carattere non valido, inclusi gli spazi, viene incluso nel foglio campioni.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
Nel foglio campioni manca la riga dell'intestazione.	Avvertenza (recuperabile in 96 ore)	<p>Attempt to load sample sheet for sequencing run '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' generated the following error: (Il tentativo di caricare il foglio campioni per la corsa di sequenziamento '140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX' ha generato l'errore seguente:)</p> <p>Error: Invalid Sample Sheet Header. (Errore Intestazione del foglio campioni non valida.) Missing required fields: Description (Campo richiesto mancante: Description (Descrizione))</p> <p>Please correct the error in order to proceed with analysis. (Correggere l'errore per poter proseguire con l'analisi.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1 minute. (Il foglio campioni verrà caricato nuovamente in circa 1 minuto.)</p> <p>The sample sheet is located in the run folder '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'. (Il foglio campioni si trova nella cartella della corsa '/data01/runs/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX'.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
Il foglio campioni contiene valori indice duplicati	Errore (recuperabile correggendo il foglio campioni)	<p>Parsing the sample sheet for sequencing run '140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2' in the sequencing run folder generated the following error(s): (Durante il parsing del foglio campioni per la corsa di sequenziamento '140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2' nella cartella della corsa di sequenziamento sono stati generati gli errori seguenti:)</p> <p>Error: Duplicate Index value found: ACTGAT (A025) for Lane: 1 (Errore: Individuato valore indice duplicato: ACTGAT (A025) per la corsia: 1)</p> <p>Invalid sample record found: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 for Index: ACTGAT (Individuato un record campione non valido: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 per l'indice: ACTGAT)</p> <p>Duplicate Index value found: ATTCCT (A027) for Lane: 1 (Individuato un valore indice duplicato: ATTCCT (A027) per la corsia: 1)</p> <p>Invalid sample record found: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 for Index: ATTCCT (Individuato un record campione non valido: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 per l'indice: ATTCCT)</p> <p>Duplicate Index value found: ACTGAT (A025) for Lane: 2 (Individuato un valore indice duplicato: ACTGAT (A025) per la corsia: 2)</p> <p>Invalid sample record found: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 for Index: ACTGAT (Individuato un record campione non valido: S109_S109__A7_A025_ACTGAT__Test_62 per l'indice: ACTGAT)</p> <p>Duplicate Index value found: ATTCCT (A027) for Lane: 2 (Individuato un valore indice duplicato: ATTCCT (A027) per la corsia: 2)</p> <p>Invalid sample record found: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 for Index: ATTCCT (Individuato un record campione non valido: S113_S113__B7_A027_ATTCCT__Test_62 per l'indice: ATTCCT)</p> <p>Correct the error to proceed with analysis. (Correggere l'errore per procedere con l'analisi.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1.0 minutes. (Il foglio campioni verrà caricato di nuovo in circa 1 minuto.)</p> <p>Sample sheet should be located in the run folder '/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2'. (Il foglio campioni dovrebbe essere posizionato nella cartella della corsa '/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY2'.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
Il valore corsia non è presente o non è valido (solo per NGS Opzione 1)	Errore (recuperabile correggendo gli ID campioni)	<p>Parsing the sample sheet for sequencing run '140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY' in the sequencing run folder generated the following error(s): (Durante il parsing del foglio campioni per la corsa di sequenziamento '140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY' nella cartella della corsa di sequenziamento sono stati generati gli errori seguenti:)</p> <p>Error: Invalid Lane value found at row: 47. (Errore: Individuato valore corsia non valido nella riga: 47.)</p> <p>Invalid value: Invalid Lane value found at row: 47. (Valore non valido: Individuato valore corsia non valido nella riga: 47.)</p> <p>Invalid value: Invalid Sample IDs found (contain characters other than alpha-numeric / dashes / underscores). (Valore non valido: Individuati ID campioni non validi (contengono caratteri che non sono alfanumerici/trattini/trattini bassi.) Invalid Sample ID values are: <blank> (Valori ID campioni non validi sono: <vuoto>)</p> <p>Correct the error to proceed with analysis. (Correggere l'errore per procedere con l'analisi.) The sample sheet will be uploaded again in approximately 1.0 minutes. (Il foglio campioni verrà caricato di nuovo in circa 1 minuto.)</p> <p>Sample sheet should be located in the run folder '/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY'. (Il foglio campioni dovrebbe essere posizionato nella cartella della corsa '/data01/runs/140220_D00409_0041_AH8P5EADXX_COPY'.)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
La corsa di sequenziamento non è riuscita. Non è presente alcun file RTA Complete. Questa notifica viene inviata quando il file RTA Complete non viene individuato dopo 20 ore.	Errore (non recuperabile - file RTAComplete.txt dopo un periodo di attesa minima di 20 ore)	Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_D12_NO_RTAComplete_TC_SC_3 (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_D12_NO_RTAComplete_TC_SC_3) Sequencing Run Status: Failed sequencing (Stato della corsa di sequenziamento: sequenziamento non riuscito) Sequencing Start Time: 2014-05-12 19:45 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 2014-05-12 19:45 PDT) Sequencing Complete Time: NA (Ora di completamento del sequenziamento: ND) Workflow Name: NA (Nome del flusso di lavoro: ND) Analysis Scheduled Time: NA (Ora programmata per l'analisi: ND) Analysis Start Time: NA (Ora di avvio dell'analisi: ND) Analysis Finish Time: NA (Ora di termine dell'analisi: ND) Analysis Output Directory: NA (Directory degli output dell'analisi: ND)
L'analisi è stata avviata. Questa notifica viene inviata all'avvio dell'analisi. Viene visualizzata dopo la comparsa del file RTA Complete, che avvia di fatto l'analisi. L'analisi impiega 1-2 ore per corsa.	Funzionamento normale	Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX) Sequencing Run Status: Analysis started (Stato della corsa di sequenziamento: analisi avviata) Sequencing Start Time: 2014-05-12 19:45 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 2014-05-12 19:45 PDT) Sequencing Complete Time: 2014-05-12 19:55 PDT (Ora di completamento del sequenziamento: 2014-05-12 19:55 PDT) Workflow Name: (Nome flusso di lavoro:) [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 (Nome flusso di lavoro: [NGS Opzione 1] cfDNAHiSeqv1.0) [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 ([NGS Opzione 2] cfDNANextSeqv1.0) Analysis Scheduled Time: 2014-05-12 20:05 PDT (Ora programmata per l'analisi: 2014-05-12 20:05 PDT) Analysis Start Time: 2014-05-12 20:06 PDT (Ora di avvio dell'analisi: 2014-05-12 20:06 PDT) Analysis Finish Time: NA (Ora di termine dell'analisi: ND) Analysis Output Directory: NA (Directory degli output dell'analisi: ND)

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
<p>L'analisi non è riuscita Il sistema rielabora automaticamente la corsa tre volte.</p>	<p>Avvertenza (recuperabile tentando di rielaborare l'analisi - ATMS rimette in coda per l'elaborazione fino a tre volte)</p>	<p>Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX) Sequencing Run Status: Analysis failed. (Stato della corsa di sequenziamento: analisi non riuscita.) It will automatically be restarted to reprocess the run. (Verrà automaticamente riavviata per rielaborare la corsa.) Sequencing Start Time: 11/05/2014 08:26 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 2014-05-11 08:26 PDT) Sequencing Complete Time: 2014-05-11 08:27 PDT (Ora di completamento del sequenziamento: 2014-05-11 08:27 PDT) Workflow Name: (Nome flusso di lavoro:) [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 (Nome flusso di lavoro: [NGS Opzione 1] cfDNAHiSeqv1.0) [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 ([NGS Opzione 2] cfDNANextSeqv1.0) Analysis Scheduled Time: 2014-05-11 08:47 PDT (Ora programmata per l'analisi: 2014-05-11 08:47 PDT) Analysis Start Time: 2014-05-11 08:57 PDT (Ora di avvio dell'analisi: 2014-05-11 08:57 PDT) Analysis Finish Time: 2014-05-11 08:59 PDT (Ora di termine dell'analisi: 2014-05-11 08:59 PDT) Analysis Output Directory: NA (Directory degli output dell'analisi: ND)</p>

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
È stato raggiunto il numero massimo di tentativi di analisi non riusciti. Questa notifica viene inviata dopo il terzo tentativo di analisi non riuscito.	Errore (non recuperabile)	Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_TC_A_3 (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_TC_A_3) Sequencing Run Status: Maximum number of analysis attempts were exhausted. (Stato della corsa di sequenziamento: esaurito il numero massimo di tentativi di analisi.) Please contact Illumina Technical Support. (Rivolgersi all'Assistenza Tecnica Illumina.) Sequencing Start Time: 13/05/2014 07:00 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 13/05/2014 07:00 PDT) Sequencing Complete Time: 2014-05-13 07:01 PDT (Ora di completamento del sequenziamento: 2014-05-13 07:01 PDT) Workflow Name: (Nome flusso di lavoro:) [NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 (Nome flusso di lavoro: [NGS Opzione 1] cfDNAHiSeqv1.0) [NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 ([NGS Opzione 2] cfDNANextSeqv1.0) Analysis Scheduled Time: 2014-05-13 07:09 PDT (Ora programmata per l'analisi: 2014-05-13 07:09 PDT) Analysis Start Time: 2014-05-13 07:11 PDT (Ora di avvio dell'analisi: 2014-05-13 07:11 PDT) Analysis Finish Time: 2014-05-13 07:12 PDT (Ora di termine dell'analisi: 2014-05-13 07:12 PDT) Analysis Output Directory: NA (Directory degli output dell'analisi: ND)
Il nome della cartella della corsa presenta caratteri non consentiti.	Errore (recuperabile rimuovendo i caratteri non consentiti)	Invalid Sequencing Run Folder name found: '140207 D00409 0027 AH8HT6ADXX' The Sequencing Run Folder name can only contain the following alphanumeric characters: a-z, A-Z, 0-9, and underscores ("_"). (Individuato un nome della cartella della corsa di sequenziamento non valido: "140207 D00409 0027 AH8HT6ADXX" Il nome della cartella della corsa di sequenziamento può contenere solo i caratteri alfanumerici seguenti: a-z, A-Z, 0-9 e i trattini bassi ("_").) No spaces or other characters are allowed. (Non sono consentiti spazi o altri caratteri.) This sequencing run folder will not be processed further. (Questa cartella della corsa di sequenziamento non verrà ulteriormente elaborata.) Correct the run folder name to requeue for analysis. (Correggere il nome della cartella della corsa per rimettere la cartella in coda per l'analisi.)

Condizione	Normale/Avvertenza/Errore	Esempio di contenuto di notifica e-mail
È stato generato il report di sequenziamento per cfDNA.	Funzionamento normale	<p>Sequencing Run Folder Name: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX (Nome della cartella della corsa di sequenziamento: 140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX)</p> <p>Sequencing Run Status: Reports generated (Stato della corsa di sequenziamento: report generati)</p> <p>Sequencing Start Time: 2014-05-12 19:45 PDT (Ora di avvio del sequenziamento: 2014-05-12 19:45 PDT)</p> <p>Sequencing Complete Time: 2014-05-12 19:55 PDT (Ora di completamento del sequenziamento: 2014-05-12 19:55 PDT)</p> <p>Workflow Name: (Nome flusso di lavoro:)</p> <p>[NGS Option 1] cfDNAHiSeqv1.0 (Nome flusso di lavoro: [NGS Opzione 1] cfDNAHiSeqv1.0)</p> <p>[NGS Option 2] cfDNANextSeqv1.0 ([NGS Opzione 2] cfDNANextSeqv1.0)</p> <p>Analysis Scheduled Time: 2014-05-12 20:05 PDT (Ora programmata per l'analisi: 2014-05-12 20:05 PDT)</p> <p>Analysis Start Time: 2014-05-12 20:06 PDT (Ora di avvio dell'analisi: 2014-05-12 20:06 PDT)</p> <p>Analysis Finish Time: 2014-05-12 21:24 PDT (Ora di termine dell'analisi: 2014-05-12 21:24 PDT)</p> <p>Analysis Output Directory: /data01/analysis_output/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_140512_200514 (Directory degli output dell'analisi: /data01/analysis_output/140207_D00409_0027_AH8HT6ADXX_140512_200514)</p>

Spegnimento dello strumento

Recupero da uno spegnimento inaspettato

Nel caso di interruzione dell'alimentazione o spegnimento accidentale da parte dell'utente durante la corsa di analisi, il sistema:

- ▶ Riavvia automaticamente il software al momento del reboot.
- ▶ Riconosce l'ultima analisi in corso al momento dello spegnimento come non riuscita e la rimette in coda per l'elaborazione.
- ▶ Genera output quando l'analisi viene completata correttamente.



NOTA

Se l'analisi non riesce, il software permette al sistema di rianalizzare la corsa fino a tre volte.

Analisi e creazione di report

Specifiche del foglio campioni e regole di convalida	24
Demultiplex e generazione di file in formato FASTQ	35
Rimessa in coda di un'analisi	36
Archiviazione e backup dei dati	38
Specifiche del report e interpretazione delle metriche	39
Verifica dell'esecuzione di ATMS	42

Specifiche del foglio campioni e regole di convalida

Questa sezione fornisce istruzioni sulla creazione del foglio campioni richiesto da VeriSeq NIPT Analysis Software per l'analisi di una cartella della corsa. Attenersi alle istruzioni per l'opzione NGS utilizzata.



NOTA

Confermare che la mappatura dell'ID campione sugli indici associati sia accurata. È richiesta la mappatura accurata per mantenere l'integrità del campione. Chiedere a una seconda persona, non la persona che lo ha creato, di verificare il foglio campioni prima di avviare la corsa di sequenziamento. Qualsiasi errore nella corrispondenza dei campioni agli indici appropriati può portare a risultati potenzialmente errati riportati per campioni non identificati correttamente.



NOTA

Includere sempre un controllo per il processo e un controllo negativo (nessun template) nel batch del campione. Il controllo per il processo (ma non il controllo negativo) dovrebbe essere aggiunto al pool della libreria e identificato come tipo di campione Control (Controllo) sul foglio campioni. Non aggiungere il controllo negativo al batch del campione o al foglio campioni.

NGS Opzione 1

VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni) richiede un foglio campioni per ciascuna cella a flusso. Per il flusso di lavoro NGS Opzione 1, i fogli campioni sono caricati durante l'impostazione della corsa di sequenziamento e collocati nella cartella di output come "SampleSheet.csv". Il foglio campioni è un file separato da virgole che contiene due sezioni: una sezione intestazione che cattura le informazioni a livello di corsa e una sezione dati che cattura gli attributi specifici per il campione. NGS Opzione 1 utilizza una cella a flusso a due corsie. Lo stesso pool di campioni viene analizzato in entrambe le corsie (1 e 2). Quando si immettono le informazioni del campione nel foglio campioni, ciascun Sample_ID, pozzetto e combinazione indici deve essere elencato in entrambe le corsie 1 e 2. Sample_ID, pozzetto e combinazione indici devono essere univoci all'interno di una corsia.

Confermare che la mappatura dell'ID campione sugli indici associati sia accurata. È richiesta la mappatura accurata per mantenere l'integrità del campione.

Vedere la [Tabella 5](#) e la [Tabella 6](#) per esempi di sezioni di intestazione e dati del foglio campioni.



NOTA

Le convenzioni per la denominazione contenute nella tabella seguente sono richieste da VeriSeq NIPT Analysis Software per importare i file di output NGS.

Tabella 5 Esempio di foglio campioni per NGS Opzione 1 (sezione intestazione)

[Header] (Intestazione)	
IEMFileVersion (Versione file IEM)	4
Investigator Name (Nome ricercatore)	
Experiment Name (Nome esperimento)	H9KY7ADXX
Date (Data)	
Workflow (Flusso di lavoro)	GenerateFASTQ (Generazione file FASTQ)
Application (Applicazione)	HiSeq FASTQ Only (Solo FASTQ HiSeq)
Assay (Saggio)	TruSeq LT
Description (Descrizione)	cfDNAHiSeqv1.0
Chemistry (Chimica)	Default (Predefinito)
[Reads] (Lecture)	
	36
[Settings] (Impostazioni)	



NOTA

La sezione intestazione del foglio campioni deve presentare l'ID esatto della cella a flusso (tutte lettere maiuscole) nel campo Experiment Name (Nome esperimento) e il campo Description (Descrizione) deve contenere "cfDNAHiSeqv1.0".

Tabella 6 Esempio di foglio campioni per NGS Opzione 1 (sezione dati)

[Data] (Dati)										
Lane (Corsia)	Sample_ID (ID_ campione)	Sample_ Name (Nome campione)	Sample_ Plate (Piastra_ campioni)	Sample_Well (Pozzetto_ campione)	I7_Index_ ID (ID_ indice_ i7)	Index (Indice)	Sample_ Project (Progetto_ campione)	Description (Descrizione)	SampleType (Tipo campione)	Library_ nM (Libreria_ nM)
1	Sample1	Sample1		A1	A002	CGATGT			Test	80,87774
1	Sample2	Sample2		B1	A005	ACAGTG			Test	75,3396
1	Sample3	Sample3		C1	A007	CAGATC			Test	87,35632
1	Sample4	Sample4		D1	A012	CTTGTA			Test	68,02508
1	Sample5	Sample5		E1	A013	AGTCAA			Test	97,49216
1	Sample6	Sample6		F1	A014	AGTTCC			Test	93,20794
1	Sample7	Sample7		G1	A018	GTCCGC			Test	63,63636
1	Sample8	Sample8		H1	A019	GTGAAA		Failed Library (Libreria non riuscita)	Test	5,2
1	Sample9	Sample9		A2	A001	ATCACG			Test	84,6395
1	Sample10	Sample10		B2	A003	TTAGGC			Test	81,5047
1	Sample11	Sample11		C2	A008	ACTTGA			Test	78,78788
1	Sample12	Sample12		D2	A010	TAGCTT			Test	83,17659
1	Sample13	Sample13		E2	A020	GTGGCC			Test	79,62382
1	Sample14	Sample14		F2	A022	CGTACG			Test	62,59143
1	Control-ID	Control-ID		G2	A025	ACTGAT			Control (Controllo)	65,20376
2	Sample1	Sample1		A1	A002	CGATGT			Test	80,87774
2	Sample2	Sample2		B1	A005	ACAGTG			Test	75,3396
2	Sample3	Sample3		C1	A007	CAGATC			Test	87,35632
2	Sample4	Sample4		D1	A012	CTTGTA			Test	68,02508
2	Sample5	Sample5		E1	A013	AGTCAA			Test	97,49216
2	Sample6	Sample6		F1	A014	AGTTCC			Test	93,20794
2	Sample7	Sample7		G1	A018	GTCCGC			Test	63,63636

2	Sample8	Sample8	H1	A019	GTGAAA	Failed Library (Libreria non riuscita)	Test	5,2
2	Sample9	Sample9	A2	A001	ATCACG		Test	84,6395
2	Sample10	Sample10	B2	A003	TTAGGC		Test	81,5047
2	Sample11	Sample11	C2	A008	ACTTGA		Test	78,78788
2	Sample12	Sample12	D2	A010	TAGCTT		Test	83,17659
2	Sample13	Sample13	E2	A020	GTGGCC		Test	79,62382
2	Sample14	Sample14	F2	A022	CGTACG		Test	62,59143
2	Control-ID	Control-ID	G2	A025	ACTGAT		Control (Controllo)	65,20376

Le regole per la convalida del foglio campioni per le sezioni intestazione e dati sono indicate nella [Tabella 7](#) e nella [Tabella 8](#). I dati riportati in ciascuna casella del foglio campioni non possono superare i 100 caratteri.



NOTA

Le convenzioni per la denominazione contenute nella tabella seguente sono richieste da VeriSeq NIPT Analysis Software per importare i file di output NGS.

Tabella 7 Regole di convalida del foglio campioni (sezione intestazione)

Campo	Campo obbligatorio	Regola di convalida
IEMFileVersion (Versione file IEM)	Sì	Deve essere 4.
Investigator Name (Nome ricercatore)	Sì	Nessuna regola di convalida.
Experiment Name (Nome esperimento)	Sì	Deve essere l'ID della cella a flusso (tutte lettere maiuscole). Convalidato con il codice a barre contenuto in runParameters.xml.
Date (Data)	Sì	Nessuna regola di convalida.
Workflow (Flusso di lavoro)	Sì	Nessuna regola di convalida.
Application (Applicazione)	Sì	Nessuna regola di convalida.
Assay (Saggio)	Sì	Nessuna regola di convalida.
Description (Descrizione)	Sì	Deve essere cfDNAHiSeqv1.0
Chemistry (Chimica)	Sì	Nessuna regola di convalida.

Tabella 8 Regole di convalida del foglio campioni per NGS Opzione 1 (sezione dati)

Nome colonna	Interpretazione	Classe	Voci valide	Campo obbligatorio	Regola di convalida
Lane (Corsia)	La corsia sulla quale si trova il campione	Intero	1, 2	Sì	Deve essere 1 o 2.
Sample_ID (ID campione)	L'ID campione (utilizzato per il report di output cADAS)	Stringa di caratteri	Univoco per indice nella cella a flusso	Sì	Per un dato ID campione, tutti i valori dei dati del foglio campioni devono essere identici fatta eccezione per la corsia. L'ID campione può contenere solo caratteri alfanumerici quali a-z, A-Z, 0-9 e trattini ("-"). Sample ID (ID campione) non può contenere spazi. Evitare di combinare trattini bassi e trattini adiacenti e multipli. A partire dalla versione 1.4, Sample_ID (ID_campione) non può iniziare con 0 (zero).

Nome colonna	Interpretazione	Classe	Voci valide	Campo obbligatorio	Regola di convalida
Sample_Name (Nome campione)	Nome del campione	Stringa di caratteri	Ignorato	No	Questo campo può essere vuoto. Non si applica alcuna regola di convalida. Il nome del campione è troncato a 100 caratteri.
Sample_Plate (Piastra_campioni)	L'ID piastra campioni	Stringa di caratteri	PXXXX dove XXXX sono caratteri numerici	No	Questo campo può essere vuoto. Non si applica alcuna regola di convalida. L'ID piastra campioni è troncato a 100 caratteri.
Sample_Well (Pozzetto_campione)	ID del pozzetto campioni	Stringa di caratteri	A01-A08 B01-B08	Sì	Sono supportati sia i formati A1 che A01. I valori sono convalidati su una espressione regolare. Il primo carattere è A-H e i successivi due possono essere 1-12 o 01-12.
I7_Index_ID (ID_indice_i7)	ID indice	Stringa di caratteri	A001-A024	Sì	Il primo carattere è sempre A seguito da tre cifre, vedere la Tabella 12 .
Index (Indice)	Composizione dell'indice	Stringa di caratteri		Sì	È consentita qualsiasi sequenza indice trovata nella Tabella 12 . Il numero totale dei valori Index (Indice) entro una data corsia deve essere otto o superiore. Se il numero è inferiore a otto, viene generato un errore. Una ulteriore convalida viene eseguita per far corrispondere la coppia di valori I7_Index_ID (ID indice i7) e Index (Indice). Per un dato valore Lane (Corsia), tutti i valori Index (Indice) devono essere univoci.
Sample_Project (Progetto_campione)	Nome del progetto	Stringa di caratteri	Ignorato	No	Questo campo può essere vuoto.
Description (Descrizione)	Descrizione del campione	Stringa di caratteri	Ignorato	No	Questo campo può essere vuoto. Se questo campo contiene la parola "failed" (non riuscito), il campione viene indicato come non riuscito e nessun risultato viene riportato per questo campione.
SampleType (Tipo campione)	Tipo di campione	Stringa di caratteri	Patient (Paziente), Test (Test), Control (Controllo)	Sì	Deve essere Patient (Paziente), Test (Test) o Control (Controllo). La convalida è sensibile alle maiuscole e alle minuscole.
Library_nM (Libreria_nM)	Concentrazione della libreria	Reale	Valori numerici	Sì	Deve essere numerico.

L'utente può escludere un campione dall'analisi indicandolo come non riuscito (sensibile alle maiuscole e alle minuscole) nel campo Description (Descrizione) per il campione contenuto nel foglio campioni. In questo modo è possibile monitorare, per l'intero flusso di lavoro, i campioni che non passano al sequenziamento a causa del mancato superamento del controllo qualità (QC) prima del sequenziamento. Il valore nel campo della descrizione del campione è incluso nel file di output e i campi dei dati contengono valori vuoti.

NGS Opzione 2

Il flusso di lavoro d'impostazione della corsa per NGS Opzione 2 non comprende un'opzione per caricare manualmente un foglio campioni durante l'impostazione della corsa. Al rilevamento di una nuova corsa, l'utente dovrà invece collocare il foglio campioni denominato `samplesheet.csv` nella cartella di output della corsa contenuta nella cartella della corsa sul server di analisi. ATMS invia all'utente una e-mail indicando che è stata rilevata una nuova corsa dopo la scrittura del file `RunParameters.xml` nella cartella della corsa nella directory `analysis server/data01/runs` e dopo l'inizio del sequenziamento. Il foglio campioni deve essere collocato nella cartella della corsa prima del termine della corsa di sequenziamento (prima che il file `RTAComplete.txt` venga scritto nella cartella della corsa).



NOTA

Se il file `samplesheet.csv` non è presente nella cartella di output della corsa nel momento in cui viene scritto il file `RTAComplete.txt`, il software di analisi invierà una notifica. Vedere [Capitolo 2 Funzionamento del sistema](#), [Notifiche di sistema](#), [Tabella 4 a pagina 10](#).

Quando si utilizza NGS Opzione 2, lo stesso pool di campioni viene analizzato sull'intera cella a flusso. I numeri delle corsie non sono specificati nel foglio campioni. Quando si immettono le informazioni nel foglio campioni, i relativi `Sample_ID`, pozzetto e combinazione indici saranno elencati una volta nella sezione dati del foglio campioni. `Sample_ID`, pozzetto e combinazione indici dovrebbero essere univoci.

Confermare che la mappatura dell'ID campione sugli indici associati sia accurata. È richiesta la mappatura accurata per mantenere l'integrità del campione.

Vedere la [Tabella 9](#) e la [Tabella 10](#) per esempi di sezioni di intestazione e dati del foglio campioni.



NOTA

Le convenzioni per la denominazione contenute nella tabella seguente sono richieste da VeriSeq NIPT Analysis Software per importare i file di output NGS.

Tabella 9 Esempio di foglio campioni per NGS Opzione 2 (sezione intestazione)

[Header] (Intestazione)	
IEMFileVersion (Versione file IEM)	4
Investigator Name (Nome ricercatore)	Nome
Experiment Name (Nome esperimento)	FlowCellID (ID cella a flusso)
Date (Data)	2/4/2014
Workflow (Flusso di lavoro)	GenerateFASTQ (Generazione file FASTQ)
Application (Applicazione)	FASTQ Only (Solo FASTQ)
Assay (Saggio)	TruSeq LT
Description (Descrizione)	cfDNANextSeqv1.0
Chemistry (Chimica)	Default (Predefinito)
[Reads] (Lecture)	
	36
[Settings] (Impostazioni)	
ReverseComplement (Complemento inverso)	0



NOTA

La sezione intestazione del foglio campioni deve presentare l'ID esatto della cella a flusso (tutte lettere maiuscole) nel campo Experiment Name (Nome esperimento) e il campo Description (Descrizione) deve contenere "cfDNANextSeqv1.0".

Tabella 10 Esempio di foglio campioni per NGS Opzione 2 (sezione dati)

[Data] (Dati)									
Sample_ID (ID_campione)	Sample_Name (Nome campione)	Sample_Plate (Piastra_campioni)	Sample_Well (Pozzetto_campione)	I7_Index_ID (ID_indice_i7)	Index (Indice)	Sample_Project (Progetto_campione)	Description (Descrizione)	SampleType (Tipo campione)	Library_nM (Libreria_nM)
Sample1	Sample1		A2	A002	CGATGT			Test	53,2
Sample2	Sample2		B2	A005	ACAGTG			Test	51
Sample3	Sample3		C2	A007	CAGATC			Test	83,3
Sample4	Sample4		D2	A012	CTTGTA			Test	79
Sample5	Sample5		E2	A013	AGTCAA			Test	67
Sample6	Sample6		F2	A014	AGTTCC			Test	44,3
Sample7	Sample7		G2	A018	GTCCGC			Test	61,9
Sample8	Sample8		H2	A019	GTGAAA			Test	62,9
Sample9	Sample9		A4	A001	ATCACG			Test	76,8
Sample10	Sample10		B4	A003	TTAGGC			Test	71,1
Sample11	Sample11		C4	A008	ACTTGA		Failed_QC (QC non riuscito)	Test	5
Sample12	Sample12		D4	A010	TAGCTT			Test	71,1
Sample13	Sample13		E4	A020	GTGGCC			Test	55
Sample14	Sample14		F4	A022	CGTACG			Test	88,6
Control-ID	Control-ID		G4	A025	ACTGAT			Controllo	64,7

Le regole di convalida del foglio campioni per le sezioni dati sono indicate nella [Tabella 11](#). I dati riportati in ciascuna casella del foglio campioni non possono superare i 100 caratteri.

Tabella 11 Regole di convalida del foglio campioni per NGS Opzione 2 (sezione dati)

Nome colonna	Interpretazione	Classe	Voci valide	Campo obbligatorio	Regola di convalida
Sample_ID (ID_campione)	L'ID campione (utilizzato per il report di output cADAS)	Stringa di caratteri	Univoco per indice nella cella a flusso	Sì	L'ID campione può contenere solo caratteri alfanumerici quali a-z, A-Z, 0-9 e trattini ("-"). Sample ID (ID campione) non può contenere spazi. Evitare di combinare trattini bassi e trattini adiacenti e multipli. A partire dalla versione 1.4, Sample_ID (ID_campione) non può iniziare con 0 (zero).
Sample_Name (Nome campione)	Nome del campione	Stringa di caratteri	Testo libero	No	Questo campo può essere vuoto. Non si applica alcuna regola di convalida. Il nome è troncato a 100 caratteri.
Sample_Plate (Piastra_campioni)	L'ID piastra campioni	Stringa di caratteri	PXXXX dove XXXX sono caratteri numerici	No	Questo campo può essere vuoto. Non si applica alcuna regola di convalida. L'ID piastra campioni è troncato a 100 caratteri.
Sample_Well (Pozzetto_campione)	ID del pozzetto campioni	Stringa di caratteri	A01-A08 B01-B08	Sì	Sono supportati sia i formati A1 che A01. I valori sono convalidati su una espressione regolare. Il primo carattere è A-H e i successivi due possono essere 1-12 o 01-12.
I7_Index_ID (ID_indice_i7)	ID indice	Stringa di caratteri	A001-A024	Sì	Il primo carattere è sempre A seguito da tre cifre.
Index (Indice)	Composizione dell'indice	Stringa di caratteri		Sì	È consentita qualsiasi sequenza indice trovata nella Tabella 12 . Il numero totale dei valori Index (Indice) entro una data corsia deve essere otto o superiore. Se il numero è inferiore a otto, viene generato un errore. Una ulteriore convalida viene eseguita per far corrispondere la coppia di valori I7_Index_ID (ID indice i7) e Index (Indice). Per ciascun foglio campioni, tutti i valori Index (Indice) sono univoci. Non possono essere duplicati.
Sample_Project (Progetto_campione)	Nome del progetto	Stringa di caratteri	Ignorato	No	Questo campo può essere vuoto.

Nome colonna	Interpretazione	Classe	Voci valide	Campo obbligatorio	Regola di convalida
Description (Descrizione)	Descrizione del campione	Stringa di caratteri	Ignorato	No	Questo campo può essere vuoto. Se questo campo contiene la parola "failed" (non riuscito), il campione viene indicato come non riuscito e nessun risultato viene riportato per questo campione.
SampleType (Tipo campione)	Tipo di campione	Stringa di caratteri	Patient (Paziente), Test (Test), Control (Controllo)	Sì	Deve essere Patient (Paziente), Test (Test) o Control (Controllo). La convalida è sensibile alle maiuscole e alle minuscole.
Library_nM (Libreria_nM)	Concentrazione della libreria	Reale	Valori numerici	Sì	Deve essere numerico.

L'utente può escludere un campione dall'analisi indicandolo come non riuscito (sensibile alle maiuscole e alle minuscole) nel campo Description (Descrizione) per il campione contenuto nel foglio campioni. In questo modo è possibile monitorare, per l'intero flusso di lavoro, i campioni che non passano al sequenziamento a causa del mancato superamento del controllo qualità (QC) prima del sequenziamento. Il valore nel campo della descrizione del campione è incluso nel file di output e i campi dei dati contengono valori vuoti. Vedere la [Tabella 12](#) per i valori indice validi.

Valori indice validi

Tabella 12 Valori indice validi

I7_Index_ID (ID indice i7)	Indice
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

Demultiplex e generazione di file in formato FASTQ

NGS Opzione 1 utilizza un demultiplexer personalizzato. NGS Opzione 2 utilizza il convertitore bcl2fastq v2 per il demultiplex e la generazione di file in formato FASTQ. Entrambe le opzioni di analisi creano un ulteriore file relativo al foglio campioni nella cartella della corsa, oltre al file SampleSheet.csv originario.

- ▶ **SampleSheet.csv:** il foglio campioni originario fornito dall'utente.
- ▶ **sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt:** un file generato da ATMS in seguito alla lettura del foglio campioni fornito dall'utente. contenente le informazioni passate alle fasi successive dell'analisi dei dati.



NOTA

Non accedere al foglio campioni quando l'analisi è in fase di elaborazione se non diversamente indicato durante la fase di convalida del foglio campioni.

Rimessa in coda di un'analisi



NOTA

Cercare di rimettere in coda un'analisi SOLO dopo aver ricevuto una notifica e-mail da parte del server relativa a un errore del foglio campioni.

È possibile rimettere in coda le corse per l'analisi se il foglio campioni contiene errori che non incidono sulla convalida o sull'analisi. Le seguenti modifiche da apportare al foglio campioni devono essere eseguite solo dopo aver ricevuto una notifica e-mail dal server indicante un errore nel foglio campioni. Ad esempio:

- ▶ Righe o colonne vuote
- ▶ Riga intestazione mancante
- ▶ Flusso di lavoro indicato nella riga dell'intestazione Description (Descrizione) non supportato
- ▶ Codice a barre della cella a flusso errato

Cartella della corsa posizionata sul server

Questa procedura descrive come rimettere in coda l'analisi quando la cartella della corsa si trova sul server.

- 1 Da un computer che si trova sulla stessa rete del server di analisi, aprire Windows Explorer e cercare la directory /runs.
- 2 Individuare la cartella della corsa che si desidera rimettere in corsa per l'analisi.
- 3 Fare clic sulla cartella della corsa e selezionare **Copia**.
- 4 Fare clic in qualsiasi punto nella directory /runs e selezionare **Incolla**.
Viene creata una copia della cartella della corsa con " - Copy" aggiunto alla fine del nome della cartella. Ad esempio: Run_Folder_Name - Copy (Corsa_Cartella_Nome - Copia).
Il sistema invia una notifica e-mail relativa ai caratteri non consentiti nel nome della cartella, che l'utente può ignorare.



NOTA

Non passare alla fase successiva fino a quando la cartella della corsa non sia stata copiata completamente. La procedura impiega circa 30 minuti.

- 5 Aprire la cartella della corsa copiata ed eliminare il file seguente:
sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt
- 6 Lavorando nella cartella della corsa copiata, modificare il file SampleSheet.csv per correggere gli errori. Rimuovere le righe o le colonne vuote.
- 7 Salvare il foglio campioni nella cartella della corsa copiata come SampleSheet.csv per sovrascrivere il file esistente.
Assicurarsi che il file rimanga in formato CVS (valori separati da virgola). Alcuni pacchetti software che utilizzano i fogli di calcolo possono modificare il formato del file senza avvisare e sovrascrivere la virgola con altri simboli. Non modificare il foglio campioni dopo averlo salvato nella cartella della corsa copiata.
- 8 Per avviare l'analisi, rinominare la cartella della corsa copiata nel modo seguente:
 - a Fare clic sulla cartella della corsa copiata e selezionare **Rinomina**.
 - b Sostituire gli spazi e i trattini con un trattino basso (_). Ad esempio, Run_Folder_Name_Copy (Corsa_Cartella_Nome_Copia).



NOTA

Non aggiungere caratteri all'inizio del nome della cartella. Ad esempio, Copy_Run_Folder_Name (Copia_Corsa_Cartella_Nome). Aggiungere i caratteri solo alla fine del nome della cartella della corsa, utilizzando solo i caratteri alfanumerici seguenti: a-z, A-Z, 0-9 e trattini bassi ("_"). Non sono consentiti spazi, trattini o altri caratteri.

Il sistema analizza automaticamente Run_Folder_Name_Copy (Corsa_Cartella_Nome_Copy).

- 9 Se sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt non viene creato entro 30 minuti, vedere *Risoluzione dei problemi per la rimessa in coda dell'analisi a pagina 38*.

Copia di una corsa completata sul server e messa in coda per l'analisi

Questa procedura descrive come copiare manualmente una cartella della corsa sul server e mettere in coda l'analisi.



NOTA

Seguire esattamente la procedura come indicato nella sequenza seguente.

Le fasi 1-5 devono essere completate prima di copiare la cartella della corsa sul server di analisi.

- 1 Aprire la cartella della corsa e spostare il file **RTAcomplete.txt** al di fuori della cartella della corsa.
- 2 Eliminare dalla cartella della corsa il file seguente:
sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt
- 3 Se necessario, modificare il foglio campioni originale per correggere gli errori o eseguire altre modifiche. Rimuovere le righe o le colonne vuote.
- 4 Salvare il foglio campioni nella cartella della corsa come SampleSheet.csv per sovrascrivere il file esistente.
Non modificare il foglio campioni dopo averlo salvato nella cartella della corsa.
- 5 Assicurarsi che la cartella della corsa non contenga ancora il file RTAComplete.txt.
- 6 Fare clic sulla cartella della corsa e selezionare **Copia**.
- 7 Da un computer che si trova sulla stessa rete del server di analisi, aprire Windows Explorer e cercare la directory /runs.
- 8 Fare clic in qualsiasi punto nella directory /runs e selezionare **Incolla**.



NOTA

Non passare alla fase successiva fino a quando la cartella della corsa non sia stata copiata completamente. La procedura impiega circa 30 minuti o più in base alla velocità della rete.

Non aggiungere caratteri all'inizio del nome della cartella. Ad esempio, Copy_Run_Folder_Name (Copia_Corsa_Cartella_Nome). Aggiungere i caratteri solo alla fine del nome della cartella della corsa, utilizzando solo i caratteri alfanumerici seguenti: a-z, A-Z, 0-9 e trattini bassi ("_"). Non sono consentiti spazi, trattini o altri caratteri.

- 9 Per avviare l'analisi copiare il file **RTAcomplete.txt** dalla posizione in cui è stato spostato e incollarlo nella cartella della corsa.
Il sistema rianalizza automaticamente la cartella della corsa.
- 10 Se sample_sheet_processed_YYYY_MM_DD_hh-mm-ss.txt non viene creato entro 30 minuti, vedere *Risoluzione dei problemi per la rimessa in coda dell'analisi a pagina 38*.

Risoluzione dei problemi per la rimessa in coda dell'analisi

- 1 Verificare la presenza di una e-mail di notifica di errore.
- 2 Rivedere l'e-mail per ottenere informazioni sugli errori presenti nel foglio campioni.
Rivedere tutto il messaggio e-mail perché l'errore pertinente il problema potrebbe essere elencato alla fine del messaggio.
- 3 Se gli errori possono essere corretti dall'utente, ripetere la procedura di rimessa in coda dell'analisi per la cartella della corsa rilevante.
- 4 Se si verifica quanto segue, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina:
 - ▶ Se l'utente non riceve una e-mail di notifica di errore.
 - ▶ L'analisi non viene eseguita.
 - ▶ Il foglio campioni non contiene erroriDurante la telefonata o nel soggetto dell'e-mail, menzionare NIPT16.

Archiviazione e backup dei dati

Illumina raccomanda di archiviare le directory /data01/runs e /data01/analysis_output in base alle politiche IT locali per l'archiviazione adottate presso la sede. Il software monitora lo spazio su disco rimanente nella directory /data01/runs e notifica gli utenti mediante una e-mail quando la capacità di archiviazione rimanente scende al di sotto di 200 GB.

VeriSeq NIPT Analysis Server non dovrebbe essere utilizzato per l'archiviazione dei dati. I dati dovrebbero essere trasferiti fuori dal server di analisi e archiviati regolarmente.

Una tipica corsa di sequenziamento compatibile con il flusso di lavoro di analisi di cfDNA richiede circa 11-13 GB per NGS Opzione 1 e circa 11-16 GB per NGS Opzione 2. La dimensione effettiva della cartella della corsa dipende dalla densità dei cluster finale. Il server fornisce più di 4 TB di spazio di archiviazione, che è sufficiente per più di 200 corse di sequenziamento.

Archiviare i dati solo quando il sistema è inattivo e quando non viene eseguita alcuna analisi o corsa di sequenziamento.

Specifiche del report e interpretazione delle metriche

La cartella di output di analisi del sequenziamento cfDNA contiene due file di testo nel formato separato da virgola. Il primo file, <Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv, contiene tutti i campioni e i dati della cella a flusso e le metriche QC. Questo file identifica inoltre la versione del software utilizzata per generare i risultati. Il secondo file, <Run_Folder_Name>_Misindexed_Results.csv, mostra sotto forma di tabulati il numero di letture sulla cella a flusso per gli indici identificati durante il demultiplex che non sono specificati nel foglio campioni. Un terzo file .txt, REPORT.Complete.txt, si trova nella cartella di output dei risultati. Questo file contiene informazioni su configurazione dell'analisi, durata dell'analisi, posizione dei file di output e i valori del checksum MD5 per i file NIPT_Results.csv e MISINDEXED_Results.csv. Un elenco completo delle metriche QC e altri valori si trova in *Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 1)* a pagina 44 e *Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 2)* a pagina 50.



ATTENZIONE

Per evitare di modificare involontariamente l'output di analisi originale, copiare i file <Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv e <Run_Folder_Name>_Misindexed_Results.csv su un altro computer prima di aprire e modificare i file.



NOTA

Illumina raccomanda di integrare i file di output generati da analisi del cfDNA/VeriSeq NIPT Analysis Software in un sistema di gestione delle informazioni del laboratorio, dove le informazioni fornite possono essere utilizzate per generare report dei pazienti per la successiva revisione da parte del personale clinico del laboratorio.

Tabella 13 Valori di annotazione del foglio campioni riportati (<Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv)

Nome colonna	Campo fonte foglio campioni
SampleID (ID campione)	Sample_ID (ID_campione)
SampleType (Tipo campione)	SampleType (Tipo campione)
Flowcell ID (ID cella a flusso)	Experiment Name (Nome esperimento)
IndexID (ID indice)	I7_Index_ID (ID_indice_i7)
Well (Pozzetto)	Sample_Well (Pozzetto_campione)
Library_nM (Libreria_nM)	Library_nM (Libreria_nM)

Tabella 14 Metriche punteggio per campione riportate (<Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv)

Nome colonna	Interpretazione
Ratio_13 (Rapporto_13)	Rapporto cromosomico 13
Ratio_18 (Rapporto_18)	Rapporto cromosomico 18
Ratio_21 (Rapporto_21)	Rapporto cromosomico 21
Ratio_X (Rapporto_X)	Rapporto cromosomico X
Ratio_Y (Rapporto_Y)	Rapporto cromosomico Y
NCV_13	Valore cromosomico normalizzato (punteggio z) 13
NCV_18	Valore cromosomico normalizzato (punteggio z) 18
NCV_21	Valore cromosomico normalizzato (punteggio z) 21
NCV_X	Valore cromosomico normalizzato (punteggio z) Z
NCV_Y	Valore cromosomico normalizzato (punteggio z) Y

Nome colonna	Interpretazione
FF_Formatted (FF_formattato)	Stima della componente fetale di cfDNA recuperato dal saggio. Riportata come una percentuale discreta e arrotondata che fornisce ulteriori informazioni su ciascun campione.

Tabella 15 Metriche QC per campione riportate (<Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv)

Nome colonna	Interpretazione	Ragione per la mancata riuscita
QCFlag (Indicatore QC)	Indicatore complessivo di QC superato (0), avvertenza (1), non riuscito (2)	Vedere la Tabella 20 .
QCWarning (Avvertenza QC)	Concatenazione di tutte le ragioni per l'avvertenza del campione (separato da ";")	Vedere la Tabella 20 .
QCFailure (Mancata riuscita QC)	Concatenazione di tutte le ragioni per la mancata riuscita del campione (separato da ";")	Vedere la Tabella 20 .
Cluster	Numero totale di cluster sulle corsie (riportato per cella a flusso)	Densità cluster bassa/elevata
TotalReads2Clusters (Letture totali sui cluster)	Rapporto delle letture recuperate sul numero di cluster sulle corsie (riportato per cella a flusso)	File BCL corrotti
MaxMisindexedReads2Clusters (Letture massime con mancato rilevamento dell'indice sui cluster)	Rapporto delle letture con mancato rilevamento dell'indice sulle corsie sui cluster in una corsia virtuale (riportato per cella a flusso)	Letture con indici imprevisti identificati sulle corsie
IndexedReads (Letture indicizzate)	Numero totale di letture indicizzate per campione sulle corsie	Problemi tecnici con Lettura indici; campione errato sulle corsie di sequenziamento
TotalIndexedReads2Clusters (Letture indicizzate totali sui cluster)	Rapporto delle letture indicizzate sui cluster (riportato per cella a flusso)	Problemi tecnici con Lettura indici
Tags (Tag)	Numero delle letture mappate su una posizione univoca nel genoma	Percentuale di errore elevata per PCR o sequenziamento; distorsione introdotta durante la creazione delle librerie
NonExcludedSites (Siti non esclusi)	Numero di tag che escludono le regioni filtrate del genoma e le letture duplicate mappate sulla medesima posizione	Basso numero di cluster, errori di sequenziamento, bassa complessità delle librerie, recuperabile di solito alla nuova elaborazione della corsa
NonExcludedSites2Tags (Siti non esclusi sulle tag)	Rapporto di NonExcludedSites (Siti non esclusi) sulle tag	Complessità delle librerie
Tags2IndexedReads (Tag sulle letture indicizzate)	Rapporto delle tag sulle letture indicizzate	Superiore al numero previsto di letture non allineate sul genoma
PerfectMatchTags2Tags (Tag con corrispondenza perfetta sulle tag)	Rapporto delle tag mappate perfettamente su tutte le tag	Percentuale di errore elevata di sequenziamento o PCR
GCBias (Distorsione GC)	Distorsioni GC residue nella distribuzione delle letture dopo la correzione	Mancata riuscita preanalitica nella raccolta/gestione dei campioni; artefatti di sequenziamento
GCR2 (R2 GC)	R2 della correzione GC (percentuale di variazione spiegata dalla correzione GC)	
NCD_13	Probabile punteggio per i denominatori del cromosoma 13	Profilo non previsto per i cromosomi del denominatore del cromosoma 13

Nome colonna	Interpretazione	Ragione per la mancata riuscita
NCD_18	Probabile punteggio per i denominatori del cromosoma 18	Profilo non previsto per i cromosomi del denominatore del cromosoma 18
NCD_21	Probabile punteggio per i denominatori del cromosoma 21	Profilo non previsto per i cromosomi del denominatore del cromosoma 21
NCD_X	Probabile punteggio per i denominatori del cromosoma X	Profilo non previsto per i cromosomi del denominatore del cromosoma X
NCD_Y	Probabile punteggio per il profilo di tutti i cromosomi	Profilo non previsto per tutti i cromosomi

Tabella 16 Metriche punteggio per campione riportate (<Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv)

Nome colonna	Interpretazione
Chr1, ..., Chr22, ChrX, ChrY	Numero totale di NonExcludedSites (Siti non esclusi) utilizzati per l'analisi di un cromosoma corrispondente (valore intero)
Chr1_Coverage, ..., Chr22_Coverage, ChrX_Coverage, ChrY_Coverage	Copertura normalizzata di ciascun cromosoma utilizzato nella valutazione dei rapporti cromosomici

Tabella 17 Metriche punteggio per batch riportate (<Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv)

Nome colonna	Interpretazione
Median_13, Median_18, Median_21, Median_X, Median_Y	Mediana del batch dei rapporti cromosomici per campioni diploidi putativi Nota: chrX e chrY si basano solo sui campioni femminili putativi
Stdev_13, Stdev_18, Stdev_21, Stdev_X, Stdev_Y	Deviazione standard del batch dei rapporti cromosomici per campioni diploidi putativi Nota: chrX e chrY si basano solo sui campioni femminili putativi

Tabella 18 Riportato per campione, più campi riportati dal foglio campioni (<Run_Folder_Name>_NIPT_Results.csv)

Nome colonna	Campo fonte foglio campioni
SampleProject (Progetto campione)	Sample_Project (Progetto_campione)
Description (Descrizione)	Description (Descrizione)
Index (Indice)	index (indice)

Tabella 19 Riportato per letture con mancato rilevamento dell'indice della cella a flusso (<Run_Folder_Name>_Misindexed_Results.csv)

Nome colonna	Interpretazione
Flow Cell (Cella a flusso)	ID della cella a flusso
Lane (Corsia)	ID della corsia
IndexID (ID indice)	ID indice Nota: Index ID A000 rappresenta qualsiasi sequenza fatta eccezione per i 24 indici che si trovano nella Tabella 12
IndexedReads (Letture indicizzate)	Numero di letture indicizzate per cella a flusso/corsia/indice

Verifica dell'esecuzione di ATMS

L'avvio del sistema lancia automaticamente il processo ATMS in secondo piano per monitorare le corse di sequenziamento e di analisi.

Per assicurarsi che ATMS sia in esecuzione:

- 1 Eseguire il comando per collegarsi al server analitico come sbsuser (si presume che \$HOSTNAME sia il nome dato del server al momento dell'impostazione durante il processo di installazione iniziale):
`ssh -l sbsuser $HOSTNAME`
- 2 Eseguire il comando per verificare il processo di ATMS:
`ps aux | grep jsvc`

Se l'output contiene jsvc.exec, il processo ATMS è in esecuzione in secondo piano. Sono disponibili tre linee di output: 1) una linea indicante un'istanza eseguita dall'utente root, 2) una linea indicante un'istanza dall'utente ATMS, e 3) una linea indicante un'istanza eseguita da qualsiasi utente che ha eseguito il comando.

Se il processo ATMS non è in esecuzione, ATMS non sta monitorando o elaborando le nuove corse fino a quando il servizio viene riavviato. Uno spegnimento o un reboot della macchina attiva un riavvio automatico del servizio. Un ingegnere dei servizi Illumina può riavviare il servizio utilizzando i privilegi root sulla macchina.



NOTA

Se si verifica uno spegnimento inaspettato, il sistema cerca di riavviare ATMS da solo.

Metriche di controllo qualità (QC)

Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 1)	44
Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 2)	50

Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 1)

Tabella 20 Strumento NGS Opzione 1: posizione doppia cella a flusso, cella a flusso a due corsie: metriche QC, limiti superiore e inferiore, designazione di Non riuscito o Avvertenza, percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza e cause potenziali.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Conteggio QC	Cluster	250.000.000	450.000.000	Avvertenza		<5% di celle a flusso	Densità cluster bassa (più probabile) o elevata (molto improbabile).
Conteggio QC	Reads2Clusters (Lecture sui cluster)	0,95	1	Avvertenza		<1% di celle a flusso	Il software non è riuscito a recuperare più del 5% delle letture registrate dallo strumento.
Conteggio QC	MaxMisindexedReads2Clusters (Lecture massime con mancato rilevamento dell'indice sui cluster)	0	0,0002	Avvertenza		<0,1%	
Conteggio QC	TotalIndexedReads2Clusters (Lecture indicizzate totali sui cluster)	0,7	1	Avvertenza		<0,1%	Sequenza di indicizzazione non riuscita.
Conteggio QC	NonExcludedSites (Siti non esclusi)	8000000	100000000	Non riuscito		<=2%	Scarsa o errata quantizzazione della libreria; numero basso di cluster; possibile recupero alla nuova elaborazione dal plasma.
Conteggio QC	NonExcludedSites2Tags (Siti non esclusi sulle tag)	0,8	1	Avvertenza		<0,1%	Scarsa diversità della libreria; possibile recupero alla nuova elaborazione dal plasma.
Conteggio QC	Tags2Reads (Tag sulle letture)	0,75	0,9	Avvertenza		<0,1%	Percentuale elevata di errore nel sequenziamento o nella PCR; possibilità di recupero al risequenziamento della stessa libreria.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Conteggio QC	PerfectMatchTags2Tags (Tag con corrispondenza perfetta sulle tag)	0,7	1	Avvertenza		1%	Percentuale elevata di errore nel sequenziamento o nella PCR; possibilità di recupero al risequenziamento della stessa libreria.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_13	0,1986891	0,2012977	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_18	0,2483363	0,2517526	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_21	0,2476093	0,2524342	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_X	0,3260502	0,3396256	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_Y	0	1,47E-08	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_13	0	6,73E-04	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_18	0	1,37E-03	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_21	0	1,33E-03	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_X	0	3,27E-03	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_Y	0	4,94E-09	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_13	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_18	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_21	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_X	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_Y	-100	1000	Non riuscito		<0,5%	Rappresentazione cromosomica inaspettata in un punto nel genoma; è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
NCV dei campioni di controllo	NCV_13	-5	4	Avvertenza	Controllo		Limiti NCV per i controlli (nessuna monosomia, nessuna trisomia).
NCV dei campioni di controllo	NCV_18	-5	4	Avvertenza	Controllo		Limiti NCV per i controlli (nessuna monosomia, nessuna trisomia).
NCV dei campioni di controllo	NCV_21	-5	4	Avvertenza	Controllo		Limiti NCV per i controlli (nessuna monosomia, nessuna trisomia).
NCV dei campioni del test	NCV_13	-5	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
NCV dei campioni del test	NCV_18	-5	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_21	-5	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_X	-100	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_Y	-6	2000	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
Distorsioni GC dei campioni di controllo	GCBias (Distorsione GC)	-0,5	0,5	Avvertenza	Controllo		Distorsioni GC rimanenti dopo la correzione GC (previsto per essere centrato intorno allo 0, solo informativo).
Distorsioni GC dei campioni del test	GCBias (Distorsione GC)	-0,5	0,5	Avvertenza	Test		Distorsioni GC rimanenti dopo la correzione GC (previsto per essere centrato intorno allo 0, solo informativo).
R2 GC dei campioni di controllo	GC R2	0	0,9999	Avvertenza	Controllo		R ² associato con la correzione GC (solo informativo).
R2 GC dei campioni del test	GC R2	0	0,9999	Avvertenza	Test		R ² associato con la correzione GC (solo informativo).

Metriche di controllo qualità (QC) e limiti superiore e inferiore (NGS Opzione 2)

Tabella 21 Strumento NGS Opzione 2: posizione singola cella a flusso, cella a flusso a quattro corsie: metriche QC, limiti superiore e inferiore, designazione di Non riuscito o Avvertenza, percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza e cause potenziali.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Conteggio QC	Cluster	300.000.000	800.000.000	Avvertenza		<5% di celle a flusso	Densità cluster bassa (più probabile) o elevata (molto improbabile).
Conteggio QC	MaxMisindexedReads2Clusters (Lecture massime con mancato rilevamento dell'indice sui cluster)	0	0,0002	Avvertenza		<0,1%	
Conteggio QC	TotalIndexedReads2Clusters (Lecture indicizzate totali sui cluster)	0,7	1	Avvertenza		<0,1%	Sequenza di indicizzazione non riuscita.
Conteggio QC	NonExcludedSites (Siti non esclusi)	8000000	100000000	Non riuscito		<=2%	Scarsa o errata quantizzazione della libreria; numero basso di cluster; possibile recupero alla nuova elaborazione dal plasma.
Conteggio QC	NonExcludedSites2Tags (Siti non esclusi sulle tag)	0,8	1	Avvertenza		<0,1%	Scarsa diversità della libreria; possibile recupero alla nuova elaborazione dal plasma.
Conteggio QC	Tags2Reads (Tag sulle letture)	0,75	0,9	Avvertenza		<0,1%	Percentuale elevata di errore nel sequenziamento o nella PCR; possibilità di recupero al risequenziamento della stessa libreria.
Conteggio QC	PerfectMatchTags2Tags (Tag con corrispondenza perfetta sulle tag)	0,7	1	Avvertenza		1%	Percentuale elevata di errore nel sequenziamento o nella PCR; possibilità di recupero al risequenziamento della stessa libreria.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_13	0,1991238	0,2008629	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_18	0,2489057	0,2511832	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_21	0,2484135	0,25163	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_X	0,329444	0,3362317	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Mediana dei rapporti cromosomici	Median_Y	0	1,236665e-08	Avvertenza		<0,1%	Rapporto cromosomico mediano inaspettatamente elevato/basso sull'intera cella a flusso; effetto di batch fortemente non corretto associato con l'estrazione o con il batch della libreria. Cercare di rielaborare i campioni dal plasma per risolvere il problema.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_13	0	0,0008695377	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_18	0	0,00113876	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_21	0	0,001608292	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_X	0	0,005090769	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Deviazione standard dei rapporti cromosomici	Stdev_Y	0	3,454837e-09	Avvertenza		<0,1%	Deviazione standard inaspettatamente elevata dei rapporti cromosomici, il che indica fonti extra di variazione precedentemente non vista; controllare l'andamento nel tempo.
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_13	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_18	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_21	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_X	-50	1000	Non riuscito		<0,1%	Rappresentazione cromosomica inaspettata dei cromosomi denominatori (riferimento); è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
Punteggi probabili per i denominatori dei cromosomi	NCD_Y	-100	1000	Non riuscito		<0,5%	Rappresentazione cromosomica inaspettata in un punto nel genoma; è improbabile che venga risolto elaborando nuovamente il campione; suggerisce "dati al di fuori dell'intervallo previsto".
NCV dei campioni di controllo	NCV_13	-5	4	Avvertenza	Controllo		Limiti NCV per i controlli (nessuna monosomia, nessuna trisomia).
NCV dei campioni di controllo	NCV_18	-5	4	Avvertenza	Controllo		Limiti NCV per i controlli (nessuna monosomia, nessuna trisomia).
NCV dei campioni di controllo	NCV_21	-5	4	Avvertenza	Controllo		Limiti NCV per i controlli (nessuna monosomia, nessuna trisomia).

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
NCV dei campioni del test	NCV_13	-5	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_18	-5	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_21	-5	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_X	-100	200	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
NCV dei campioni del test	NCV_Y	-6	2000	Avvertenza	Test		Limiti NCV per i campioni del test (nessuna monosomia, frazione fetale entro l'intervallo previsto - generoso).
Distorsioni GC dei campioni di controllo	GCBias (Distorsione GC)	-0,5	0,5	Avvertenza	Controllo		Distorsioni GC rimanenti dopo la correzione GC (previsto per essere centrato intorno allo 0, solo informativo).
Distorsioni GC dei campioni del test	GCBias (Distorsione GC)	-0,5	0,5	Avvertenza	Test		Distorsioni GC rimanenti dopo la correzione GC (previsto per essere centrato intorno allo 0, solo informativo).

Categoria	Metrica	Limite inferiore	Limite superiore	Non riuscito/ Avvertenza	Tipo campione	Percentuale prevista di Non riuscito/Avvertenza	Cause potenziali
R2 GC dei campioni di controllo	GC R2	0	0,9999	Avvertenza	Controllo		R ² associato con la correzione GC (solo informativo).
R2 GC dei campioni del test	GC R2	0	0,9999	Avvertenza	Test		R ² associato con la correzione GC (solo informativo).

Studio sul confronto dei metodi

Dati sul confronto dei metodi57

Dati sul confronto dei metodi

Per questo studio, 105 librerie preparate in precedenza sono state sequenziate ed elaborate con VeriSeq NIPT Analysis Software (16 campioni). Questi campioni sono stati prima elaborati con il test Verifi® e messi in multiplex in 7 librerie, ciascuna composta da 14 campioni di plasma materno, 1 campione materno di controllo positivo raggruppato in pool e 1 controllo non template o NTC. La [Tabella 22](#) mostra la composizione del campione di ciascuna libreria.

Tutti i singoli 98 campioni non controllo hanno superato il controllo qualità e sono stati analizzati per identificare la concordanza con i risultati di Verifi. Ciascun campione è stato classificato in base ai valori NCV per la trisomia 13/18/21 (utilizzando una soglia di NCV = 4), per la presenza del cromosoma Y (utilizzando una soglia di NCV = 10) e per la monosomia X (utilizzando una soglia di NCV_X = -4 e il cromosoma Y non era presente). La concordanza complessiva espressa in percentuale tra VeriSeq NIPT e Verifi è mostrata nella [Tabella 23](#).

Sono state osservate due discrepanze. La prima discrepanza osservata era per il cromosoma 13 che era stato classificato come trisomia 13 dal test Verifi e classificato negativo da Veriseq NIPT Analysis Software (16 campioni). Le informazioni cliniche fornite successivamente per questo campione sono risultate negative per la trisomia 13. Un'altra discrepanza osservata era la trisomia 18 e per questo campione non era disponibile alcuna informazione relativa all'esito clinico.

Tabella 22 Distribuzione dei campioni sulle librerie

Libreria	Controllo	MX	T13	T18	T21	Non affetto
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
Totale	7	2	2	2	8	84

Tabella 23 Concordanza complessiva espressa in percentuale tra VeriSeq NIPT e Verifi

Concordanza complessiva	
Classe 13	98,98%
Classe 18	98,98%
Classe 21	100%
Crom. Y presente/assente	100%
Classe monosomia X	100%

Assistenza Tecnica

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

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

Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

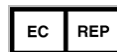
Area geografica	Gratuito	Locale
Nord America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	400.066.5835	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940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

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

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



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



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



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

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®