

# Instrument MiSeqDx<sup>MD</sup>

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

N° de référence DX-410-1001

## Utilisation prévue

L'instrument MiSeqDx est destiné au reséquençage ciblé de bibliothèques d'ADN provenant d'ADN génomique humain extrait de sang entier périphérique ou de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FPPE), à utiliser avec les tests de diagnostic *in vitro* réalisés sur l'instrument. L'instrument MiSeqDx n'est pas destiné au séquençage de génome entier ou *de novo*. L'instrument MiSeqDx doit être utilisé avec les réactifs de diagnostic *in vitro* enregistrés, répertoriés, homologués et approuvés, ainsi qu'avec le logiciel d'analyse.

## Principes procéduraux

L'instrument MiSeqDx d'Illumina est destiné au reséquençage ciblé d'ADN humain au moyen de consommables de séquençage d'Illumina et de bibliothèques préparées à partir d'ADN génomique humain extrait de sang entier périphérique ou de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FPPE) à l'aide de réactifs de diagnostic *in vitro* enregistrés, répertoriés, homologués et approuvés. Les bibliothèques sont préparées à partir de cibles amplifiées auxquelles sont ajoutés des index d'échantillons et des séquences de saisie. Les bibliothèques d'échantillons sont capturées sur la Flow Cell puis séquençées sur l'instrument à l'aide de la chimie de séquençage par synthèse (SBS). La chimie SBS utilise une méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter les bases à simple nucléotide à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Le logiciel d'analyse en temps réel (RTA) exécute les analyses d'images et la définition des bases tout en affectant un score de qualité à chacune des bases de chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, l'instrument MiSeqDx traite les appels de bases par le biais d'une analyse secondaire. Le traitement comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF contenant des renseignements sur les variants à des positions spécifiques dans le génome de référence. MiSeqDx utilise différents modules pour l'analyse secondaire en fonction du flux de travail. Les modules pour les flux de travail des appels de variants germinaux ou somatiques sont accessibles, tout comme les modules pour les tests ayant un usage précis.

## Configuration à amorçage double

La configuration à amorçage double comprend le matériel, le logiciel et les procédures d'installation pour permettre à l'instrument MiSeqDx d'effectuer des tests de séquençage diagnostic *in vitro* et des tests de séquençage destinés uniquement à la recherche. La configuration à amorçage double permet à l'utilisateur de passer du mode diagnostic au mode recherche de l'instrument, et vice versa. Les RFID sur les consommables de séquençage empêchent les réactifs de séquençage qui sont utilisés en mode recherche de servir pour les analyses de séquençage diagnostic.

## Limites de la procédure

- 1 Destiné au diagnostic *in vitro*.
- 2 Les résultats présentés sur l'étiquetage ont été obtenus au moyen de panels de tests représentatifs utilisant du sang entier périphérique ou des lignées cellulaires pour la performance du flux de travail germinaux et de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FPPE) ou de lignées cellulaires FPPE pour la performance du flux de travail somatique, combinés aux réactifs et aux modules du logiciel décrits. Les caractéristiques de performance sont fournies à titre d'information uniquement. Conformément aux contrôles spéciaux pour les analyseurs de séquence d'ADN à débit élevé, les tests de validation présentés ne servent qu'à illustrer les capacités générales de l'instrument et n'établissent pas ses capacités ni sa pertinence en ce qui a trait aux demandes particulières.

Tous les tests diagnostiques développés en vue d'être utilisés sur cet instrument requièrent une validation complète de tous les aspects de la performance.

- 3 Ce produit présente les limites suivantes :
  - Sortie de séquençage  $\geq 5$  Gb
  - Lectures passant le filtre  $\geq 15$  millions
  - Longueur de lecture (en analyse à lecture appariée)  $2 \times 150$  pb
  - Bases supérieures à Q30  $\geq 80$  % à une longueur de lecture de  $2 \times 150$  pb (plus de 80 % des bases ont un score de qualité Phred supérieur à 30, ce qui indique une exactitude de la définition des bases supérieur à 99,9 %)
- 4 L'instrument MiSeqDx n'a été validé que pour le séquençage des bibliothèques d'ADN humain extrait de sang entier périphérique et de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FPPE). Les bibliothèques générées à partir d'autres types d'échantillons ne doivent pas être utilisées avec cet instrument à des fins de diagnostic *in vitro*. La performance de cet instrument pour le séquençage des acides nucléiques microbiens provenant d'échantillons cliniques n'a pas été établie.
- 5 MiSeqDx est destiné au diagnostic *in vitro* et doit être utilisé avec les réactifs ou les tests de diagnostic *in vitro* enregistrés, répertoriés, homologués et approuvés. L'instrument MiSeqDx peut être utilisé à des fins de diagnostic *in vitro* avec les tests de diagnostic *in vitro* ou les réactifs enregistrés suivants.

Nom	N° de référence	N° de document de la notice d'accompagnement
Panel RAS étendu Praxis® (É.-U. seulement)	20012431	1000000037190
Test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx	DX-102-1004 DX-102-1003	15038347
Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx	DX-102-1001	15038344
Test diagnostique de la trousse d'amplicons TruSeq personnalisée	20005718	1000000029772
Trousse de réactifs MiSeqDx v3	20012552/ 20037124	1000000030849

Les limites des réactifs universels et les caractéristiques de performance décrites dans la présente notice d'accompagnement sont basées sur des tests représentatifs. Dans le cas des tests de diagnostic *in vitro*, reportez-vous à la notice d'accompagnement spécifique au test pour connaître l'utilisation prévue, les variants détectés et les types d'échantillons.

- 6 Les indels (insertions, délétions et combinaisons des deux) dont la longueur est de plus de 25 pb ne sont pas alignés par le logiciel de test. Par conséquent, les indels de plus de 25 pb ne sont pas détectables par le logiciel de test.
- 7 Le système a été validé pour la détection des variants à simple nucléotide (SNV), les délétions d'au plus 25 pb et les insertions d'au plus 24 pb lorsqu'il est utilisé avec le logiciel des modules d'analyse des variants germinaux et somatiques. Pour la définition des variants somatiques, à une fréquence de variant de 0,05, des délétions de 25 pb et des insertions de 18 pb ont été détectées.
- 8 Il se peut que les lectures d'amplicons affichant un contenu de variants extrême ne soient pas alignées par le logiciel de test, et que la région soit ainsi signalée comme étant de type sauvage. Les contenus extrêmes comprennent :
  - les lectures comportant plus de trois indels;
  - les lectures d'une longueur d'au moins 30 pb dont le contenu SNV est supérieur à 4 % de la longueur totale d'amplicon cible (excluant les régions sondées);
  - les lectures d'une longueur inférieure à 30 pb dont le contenu SNV est supérieur à 10 % de la longueur totale de l'amplicon (y compris les régions sondées).
- 9 Les variants importants, y compris les variants à multiples nucléotides (MNV) et les indels importants, peuvent être désignés comme plusieurs variants distincts de plus petite taille dans le fichier VCF de sortie.
- 10 Les variants de délétion peuvent être filtrés ou omis lorsqu'ils s'étendent sur deux amplicons qui se chevauchent, si la longueur de la délétion est supérieure ou égale au chevauchement entre les amplicons.

- 11 Le système ne peut détecter les indels s'ils sont directement adjacents à un primer et qu'il n'y a pas d'amplicons se chevauchant. Pour les régions contenant des amplicons de chevauchement, le test ne peut pas détecter des délétions lorsque la zone de chevauchement est plus petite que la délétion à détecter. Par exemple, si la région de chevauchement entre deux amplicons adjacents est de deux (2) bases, le test ne détectera aucune délétion, pas même ces deux bases. Une délétion de base unique au niveau de ces bases peut être détectée.
- 12 Comme avec n'importe quel flux de travail de préparation de librairie à base d'hybridation, les polymorphismes, mutations, insertions ou délétions sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et, par conséquent, les définitions obtenues durant le séquençage. Par exemple :
  - Un variant en phase avec un variant dans la région du primer peut ne pas être amplifié, ce qui entraîne un faux négatif.
  - Les variants dans la région du primer pourraient empêcher l'amplification de l'allèle de référence et entraîner une définition de variant homozygote erronée.
  - Les variants d'indels dans la région du primer peuvent entraîner un faux positif à la fin de la lecture adjacente au primer.
- 13 Les indels peuvent être filtrés en raison du biais de brin, s'ils se trouvent près de la fin d'une lecture et sont écrêtés doucement durant l'alignement.
- 14 Les petits MNV n'ont pas été validés.
- 15 Les variants du nombre de copies ou les variants structurels, comme les fusions et les translocations, n'ont pas été validés.
- 16 Limites spécifiques au flux de travail germinaux :
  - Le module d'analyse des variants germinaux, utilisé sur l'instrument MiSeqDx, est conçu pour produire des résultats qualitatifs aux fins de la définition des variants germinaux (p. ex., homozygote, hétérozygote, type sauvage).
  - Lorsque la trousse est utilisée avec le module d'analyse des variants germinaux, la couverture minimale par amplicon requise pour obtenir une définition de variants précise est de 150x. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées ont une incidence sur la couverture. Le contenu génomique, notamment la teneur en GC, peut avoir une incidence sur la couverture.
  - La variation du nombre de copies peut déterminer si un variant est identifié comme étant homozygote ou hétérozygote.
  - Dans certains contextes répétitifs, les variants sont filtrés dans les fichiers VCF. Le filtre de répétitions RMxN sert à filtrer les variants lorsque la séquence du variant se retrouve, en totalité ou en partie, à répétition dans le génome de référence adjacent à la position du variant. En ce qui concerne la définition des variants germinaux, il faut qu'il y ait au moins neuf répétitions dans le génome de référence pour qu'un variant soit filtré, et seules les répétitions d'une longueur d'au plus 5 pb seront prises en compte (R5x9).
- 17 Limites spécifiques au flux de travail somatique :
  - Le système MiSeqDx utilisant le module d'analyse des variants somatiques est conçu pour produire des résultats qualitatifs aux fins de la définition des variants somatiques (p. ex., présence d'un variant somatique dont la fréquence de variant est supérieure ou égale à 0,026, avec une limite de détection de 0,05).
  - Lorsque la trousse est utilisée avec le module d'analyse des variants somatiques, la couverture minimale par amplicon requise pour obtenir une définition de variants précise est de 450x par pool d'oligonucléotides. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées ont une incidence sur la couverture. Le contenu génomique, notamment la teneur en GC, peut avoir une incidence sur la couverture.
  - Dans certains contextes répétitifs, les variants sont filtrés dans les fichiers VCF. Le filtre de répétitions RMxN sert à filtrer les variants lorsque la séquence du variant se retrouve, en totalité ou en partie, à répétition dans le génome de référence adjacent à la position du variant. En ce qui concerne la définition des variants somatiques, il faut qu'il y ait au moins six répétitions dans le

génomique de référence pour qu'un variant soit filtré, et seules les répétitions d'une longueur d'au plus 3 pb seront prises en compte (R3x6).

- Le module d'analyse des variants somatiques ne peut distinguer les variants germinaux des variants somatiques. Le module est conçu pour détecter les variants dans une fourchette de fréquences de variant, mais la fréquence de variant ne peut servir à différencier les variants somatiques et germinaux.
- Le tissu normal dans l'échantillon a une incidence sur la détection des variants. La limite de détection indiquée est fondée sur une fréquence de variant relative à l'ADN total extrait des tissus tumoraux et normaux.

## Composants du produit

Le système MiSeqDx d'Illumina comprend les composants suivants :

Instrument MiSeqDx (n° de référence DX-410-1001)

Les composants logiciels suivants sont nécessaires au fonctionnement et à l'analyse des données sur l'instrument MiSeqDx :

Application logicielle	Fonction	Description
Logiciel d'exploitation de MiSeq (MOS)	Commande le fonctionnement de l'instrument.	L'application logicielle MOS gère le fonctionnement de l'instrument au cours du séquençage et génère des images utilisées par le logiciel d'analyse en temps réel (RTA). Pour plus de renseignements, consultez le <i>Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 1000000021961)</i> .
Logiciel d'analyse en temps réel (RTA)	Effectue l'analyse primaire.	L'application logicielle RTA convertit les images générées par MOS pour chaque plaque par cycle de l'analyse de séquençage dans les fichiers de définition des bases qui constituent des entrées pour les modules d'analyse dans Local Run Manager. L'application logicielle RTA ne contient pas d'interface utilisateur.
Local Run Manager	Interface pour la sélection du module.	Le logiciel Local Run Manager est une solution intégrée sur instrument, destinée à la gestion des utilisateurs, à la réalisation d'analyses secondaires et à la surveillance de l'état de progression. Pour plus de renseignements, consultez le <i>Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)</i> .
Module d'analyse des variants somatiques	Effectue l'analyse secondaire.	Ce module d'analyse de Local Run Manager traite les appels de bases par le biais d'analyses secondaires. Le processus comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la création de rapports. L'appel des variants (Pisces) génère des fichiers VCF qui contiennent des renseignements sur les variants que l'on trouve à des positions spécifiques dans un génome de référence et comprend la fréquence de variant mesurée.
Module d'analyse des variants germinaux	Effectue l'analyse secondaire.	Ce module d'analyse de Local Run Manager traite les appels de bases par le biais d'analyses secondaires. Le processus comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la création de rapports. L'appel des variants (Pisces) génère des fichiers VCF qui contiennent des renseignements sur les variants que l'on trouve à des positions spécifiques dans un génome de référence et détermine si un variant est identifié comme étant hétérozygote ou homozygote.

## Stockage et manipulation

Élément	Caractéristique
Température	Transport et stockage : de -10 °C à 40 °C (de 14 °F à 104 °F) Conditions d'utilisation : de 19 °C à 25 °C (de 66 °F à 77 °F)
Humidité	Transport et stockage : humidité sans condensation Conditions d'utilisation : de 30 % à 75 % d'humidité relative (sans condensation)

## Équipement et matériel nécessaires, non fournis

### Consommables pour le séquençage

Trousse de réactifs MiSeqDx v3 (référence 20012552 / 20037124)

### Consommables fournis par l'utilisateur

Assurez-vous que les consommables suivants fournis par l'utilisateur sont disponibles avant de lancer une analyse.

Consommable	Utilisation
Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	Nettoyage du verre et de la platine de Flow Cell
Tissu de laboratoire non pelucheux	Nettoyage de la platine de Flow Cell
Papier pour lentilles, 10,2 × 15,2 cm (4 × 6 po)	Nettoyage de la Flow Cell
Tween 20	Nettoyage de l'instrument
Brucelles en plastique à bout carré (facultatif)	Retrait de la Flow Cell du contenant de livraison
Eau de laboratoire	Nettoyage de l'instrument

### Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

Utilisez toujours de l'eau de laboratoire pour réaliser des procédures sur l'instrument. N'utilisez jamais d'eau courante.

Tous les exemples suivants sont acceptables :

- PW1 d'Illumina
- Eau 18 mégohms (MΩ)
- Eau Milli-Q
- Eau Super-Q
- Eau de qualité biologie moléculaire

## Avertissements et précautions

### ATTENTION

La loi fédérale américaine n'autorise la vente de ce dispositif que sur ordonnance ou par un médecin ou tout autre professionnel de la santé autorisé par la législation de l'État dans lequel il ou elle exerce à utiliser ou ordonner l'utilisation de cet appareil.

- 1 **Certains composants des réactifs fournis par Illumina pour utilisation avec l'instrument MiSeqDx contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur.** Pour obtenir des renseignements sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique à l'adresse [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Manipulez tous les échantillons de sang comme si vous les saviez infectés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), du virus de l'hépatite B humain (VHB) ou d'autres agents pathogènes transmissibles par le sang (précautions universelles).
- 3 Le non-respect des procédures décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
- 4 Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de la trousse.

- 5 Les pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène dans le laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination par des produits PCR peut causer des résultats erronés et non fiables.
- 6 Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de préamplification et de postamplification aient chacune un équipement et des consommables qui leurs soient réservés (p. ex., pipettes, pointes de pipette, blocs chauffants, agitateurs vortex et centrifugeuses).
- 7 La paire index-échantillon doit correspondre exactement au schéma imprimé de la plaque. Le logiciel Local Run Manager inscrit automatiquement les primers d'index associés au nom de chaque échantillon lorsque ces derniers sont entrés dans le module. On recommande à l'utilisateur de vérifier les primers d'index associés aux échantillons avant de lancer l'analyse de séquençage. Toute divergence entre le schéma de l'échantillon et de la plaque entraînera une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats erroné.
- 8 Il est vivement recommandé d'installer un logiciel antivirus fourni par l'utilisateur afin de protéger l'ordinateur des virus. Consultez le manuel de l'utilisateur pour obtenir des instructions relatives à l'installation.
- 9 N'utilisez pas l'instrument MiSeqDx si l'un des panneaux a été retiré. L'utilisation de l'instrument, lorsque l'un des panneaux a été retiré, crée un risque d'exposition à la tension d'alimentation et à plusieurs tensions continues.
- 10 Ne touchez pas la platine de Flow Cell dans le compartiment de Flow Cell. Le réchauffeur dans ce compartiment fonctionne entre 22 °C et 95 °C et peut causer des brûlures.
- 11 L'instrument pèse environ 57 kg (126 lb) et peut causer des blessures graves s'il tombe ou s'il est manipulé sans précaution.

## Mode d'emploi

Le mode d'emploi suivant de l'instrument MiSeqDx requiert l'utilisation des réactifs fournis dans la trousse de réactifs MiSeqDx v3.

### Création d'une analyse dans Local Run Manager

Pour obtenir des instructions détaillées, reportez-vous au *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)* et au guide du module d'analyse de Local Run Manager que vous utilisez.

- 1 Cliquez sur **Create Run** (Créer l'analyse), puis sélectionnez le module d'analyse des variants germinaux ou des variants somatiques dans Local Run Manager.
- 2 Entrez un nom qui désignera l'analyse, du séquençage jusqu'à la fin du processus.
- 3 Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
- 4 [Facultatif] Saisissez une description de l'analyse, pour l'identifier.  
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.

### Importation des fichiers de manifeste à analyser

- 1 Assurez-vous que les fichiers de manifeste que vous voulez importer se trouvent dans un emplacement réseau accessible connecté à l'instrument ou sur une clé USB.
- 2 Sélectionnez **Import Manifests** (Importer les fichiers de manifeste).
- 3 Accédez aux fichiers de manifeste et sélectionnez les fichiers à ajouter.

### Indiquer des échantillons pour l'analyse


Sélectionnez les échantillons à analyser à l'aide des options suivantes :

**Saisie des échantillons manuellement** : Utilisez le tableau vide à l'écran Create Run (Créer l'analyse).


**Importation des échantillons** : Naviguer vers un fichier externe en format. Il est possible de télécharger un modèle sur l'écran Create Run (Créer une analyse).

Après avoir rempli le tableau des échantillons, il est possible d'exporter les renseignements concernant les échantillons vers un fichier externe, puis d'utiliser le fichier comme référence lors de la préparation de bibliothèques ou d'importer le fichier pour une autre analyse.

## Saisie manuelle des échantillons

- 1 Choisissez le nombre d'échantillons et l'ensemble d'index dans la liste déroulante.
- 2 Entrez un nom d'échantillon unique (*module d'analyse des variants somatiques*) ou l'identifiant de l'échantillon (*module d'analyse des variants germinaux*).  
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.  
Dans le cas du module d'analyse des variants somatiques, la saisie du nom de l'échantillon dans un puits d'échantillon inscrit automatiquement le puits correspondant dans l'autre pool.
- 3 [Facultatif] Pour les échantillons de contrôle positif ou négatif, faites un clic droit et sélectionnez le type de contrôle.  
Dans le cas du module d'analyse des variants somatiques, la saisie du contrôle dans l'un des puits d'échantillon inscrit automatiquement le même contrôle dans le puits correspondant de l'autre pool.
- 4 [Facultatif] Sélectionnez l'onglet Description et entrez une description de l'échantillon. Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.  
Dans le cas du module d'analyse des variants somatiques, la saisie de la description pour un échantillon inscrit automatiquement le puits correspondant dans l'autre pool.
- 5 Cliquez sur l'onglet **Index 1 (i7)** et sélectionnez l'adaptateur d'index 1 dans la liste déroulante.
- 6 Cliquez sur l'onglet **Index 2 (i5)** et sélectionnez l'adaptateur d'index 2 dans la liste déroulante.
- 7 Sélectionnez un fichier de manifeste dans la liste déroulante Manifest (Manifeste).  
Dans le cas du module d'analyse des variants somatiques, les échantillons du pool A requièrent un fichier de manifeste différent de celui des échantillons du pool B.
- 8 Choisissez l'une des options pour afficher, imprimer ou enregistrer la présentation de la plaque à titre de référence pour la préparation des bibliothèques :
  - Cliquez sur l'icône  **Print** (Imprimer) pour afficher la présentation de la plaque. Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer la présentation de la plaque.
  - Sélectionnez **Export** (Exporter) pour exporter l'information sur les échantillons dans un fichier externe.
- 9 Cliquez sur **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

## Importation des échantillons

- 1 Cliquez sur **Import Samples** (Importer des échantillons) et rendez-vous à l'emplacement du fichier contenant les informations des échantillons. Il est possible d'importer deux types de fichiers.
  - Cliquez sur **Template** (Modèle) à l'écran Create Run (Créer l'analyse) pour établir une nouvelle présentation de plaque. Le fichier de modèle contient les en-têtes de colonnes corrects pour l'importation. Saisissez les renseignements sur les échantillons à analyser dans chaque colonne. Supprimez l'information donnée en exemple dans les cellules inutilisées, puis enregistrez le fichier.
  - Utilisez un fichier de renseignements d'échantillon préalablement exporté en utilisant la fonction Export (Exporter) du module d'analyse.
- 2 Cliquez sur l'icône  **Print** (Imprimer) pour afficher la présentation de la plaque.
- 3 Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer la présentation de la plaque à titre de référence pour la préparation des bibliothèques.
- 4 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

## Préparation de la cartouche de réactifs

Suivez les instructions suivantes pour savoir comment décongeler les réactifs à l'aide d'un bain d'eau à température ambiante.

- 1 Retirez la cartouche de réactifs de son lieu de stockage maintenu entre -15 °C et -25 °C.
- 2 Placez la cartouche de réactifs dans un bain d'eau contenant assez d'eau déionisée à température ambiante pour submerger la base de la cartouche de réactifs jusqu'à la ligne d'eau imprimée sur la cartouche de réactifs. Le niveau de l'eau ne doit pas dépasser la ligne de délimitation maximale.

Figure 1 Ligne de délimitation maximale de l'eau



- 3 Laissez la cartouche décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ 60 à 90 minutes ou jusqu'à décongélation complète.
- 4 Retirez la cartouche du bain d'eau et tapotez-la doucement contre la paillasse pour retirer l'eau de la base de la cartouche. Séchez la base de la cartouche. Assurez-vous que l'eau n'a pas éclaboussé la partie supérieure de la cartouche de réactifs.

### Inspection de la cartouche de réactifs

- 1 Renversez la cartouche de réactifs 10 fois pour mélanger les réactifs décongelés, puis vérifiez que toutes les positions sont décongelées.

#### REMARQUE

Il est essentiel que les réactifs contenus dans la cartouche soient parfaitement décongelés et mélangés afin de garantir un séquençage correct.

- 2 Vérifiez les réactifs des positions 1, 2 et 4 pour vous assurer qu'ils sont complètement mélangés et qu'ils ne contiennent pas de précipités.
- 3 Tapotez doucement la cartouche sur la paillasse pour éliminer les bulles d'air dans les réactifs.

#### REMARQUE

Comme les tubes des dispositifs d'aspiration MiSeqDx descendent au fond de chaque réservoir pour aspirer les réactifs, il est important qu'il ne reste aucune bulle d'air dans les réservoirs.

- 4 Placez la cartouche de réactifs sur la glace ou réservez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C (pendant un maximum de six heures) jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse. Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.

### Préparation des échantillons pour le séquençage

Pour savoir comment préparer les bibliothèques d'échantillons pour le séquençage, y compris la dilution et le regroupement de bibliothèques, consultez la section Mode d'emploi de la notice d'accompagnement sur la préparation de bibliothèques.

La dilution des bibliothèques d'échantillons dépend de la complexité des pools d'oligonucléotides. L'optimisation de la densité des amplifiats sur MiSeqDx est requise; la densité optimale des amplifiats varie selon le test de préparation de bibliothèques.

### Chargement des bibliothèques d'échantillons sur la cartouche

Lorsque la cartouche de réactifs est complètement décongelée et prête à l'emploi, vous pouvez charger les échantillons sur la cartouche.

- 1 Utilisez une pointe de pipette séparée, propre et vide de 1 ml pour percer l'opercule en aluminium scellant le réservoir sur la cartouche de réactifs étiquetée **Load Samples** (Charger les échantillons).

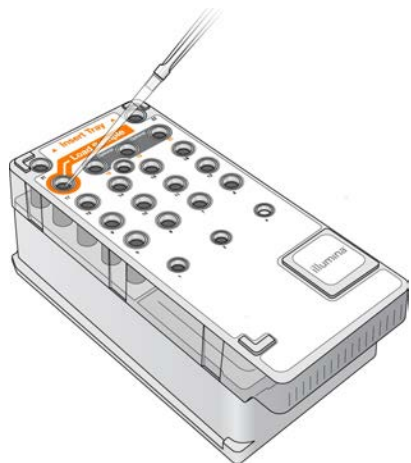
#### REMARQUE

Ne percez aucun autre opercule. Les autres positions des réactifs sont percées automatiquement au cours de l'analyse.

- 2 À l'aide de la pipette, transférez 600 µl des bibliothèques d'échantillons du tube **DAL** dans le réservoir **Load Samples** (Charger les échantillons). Évitez tout contact avec l'opercule en aluminium.
- 3 Vérifiez s'il y a des bulles d'air dans le réservoir après le chargement de l'échantillon. Si des bulles d'air sont présentes, tapotez légèrement la cartouche sur la paillasse pour les libérer.



Figure 2 Chargement des bibliothèques



- 4 Passez directement à la configuration de l'analyse depuis l'interface MiSeq Operating Software (MOS).

### Configuration de l'analyse

Reportez-vous au *Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 1000000021961)* pour connaître toutes les instructions de configuration de l'analyse.

- 1 Ouvrez une session sur MiSeqDx au moyen de votre mot de passe du logiciel Local Run Manager.
- 2 À l'écran d'accueil du logiciel MOS, sélectionnez **Sequence** (Séquence).
- 3 Sélectionnez une analyse dans la liste, puis cliquez sur **Next** (Suivant).  
Une série d'écrans de configuration de l'analyse s'ouvre dans l'ordre suivant : Load Flow Cell (Charger la Flow Cell), Load Reagents (Charger les réactifs), Review (Révision) et Pre-Run Check (Vérification avant analyse).
- 4 Lorsque l'écran Load Flow Cell (Charger la Flow Cell) s'affiche, nettoyez et chargez la Flow Cell.
- 5 Fermez le verrou de Flow Cell et la porte du compartiment de Flow Cell.  
Le verrou et la porte du compartiment doivent être fermés avant le lancement de l'analyse. Une fois la Flow Cell chargée, le logiciel lit et enregistre l'identification par radiofréquence (RFID). Une confirmation de lecture RFID correcte s'affiche dans le coin inférieur droit de l'écran.
- 6 Suivez les indications du logiciel pour charger le flacon de solution SBS (PR2) MiSeqDx. Vérifiez que le flacon à déchets est vide et chargez la cartouche de réactifs.  
Lorsque le flacon de solution SBS (PR2) MiSeqDX et la cartouche de réactifs sont chargés, le logiciel lit et enregistre la lecture RFID. Une confirmation de lecture RFID correcte s'affiche dans le coin inférieur droit de l'écran.
- 7 L'écran Sequencing (Séquençage) s'ouvre lorsque l'analyse démarre. Cet écran fournit une représentation visuelle de l'analyse en cours, y compris les intensités et les scores de qualité.

## Résultats

Le logiciel intégré Real-Time Analysis (RTA) exécute les analyses d'images et la définition des bases, et affecte un score de qualité à chacune des bases de chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, le module de l'instrument MiSeqDx qui a été choisi à la section *Création d'une analyse dans Local Run Manager*, page 6, commence l'analyse secondaire, comme il est décrit ici.

### Démultiplexage

Le démultiplexage compare chaque séquence de lecture d'index aux séquences d'indexage définies pour l'analyse. Aucune valeur de qualité n'est prise en compte lors de cette étape.

Les lectures d'index sont identifiées en suivant les étapes ci-dessous :

- Les échantillons sont numérotés en commençant par 1, selon l'ordre dans lequel ils sont classés pour l'analyse.

- Le numéro d'échantillon 0 est réservé aux amplifiats qui n'ont pas été assignés à un échantillon.
- Les amplifiats sont assignés à un échantillon lorsque la séquence d'indexage est identique ou lorsqu'il y a un seul mésappariement par lecture d'index.

### Génération des fichiers FASTQ

Après le démultiplexage, le logiciel génère une analyse intermédiaire au format FASTQ, qui est un format texte utilisé pour représenter des séquences. Les fichiers FASTQ contiennent les lectures pour chaque échantillon ainsi que les scores de qualité connexes. Tous les contrôles utilisés pour l'analyse et tous les amplifiats n'ayant pas passé le filtre sont exclus.

Chaque fichier FASTQ contient des lectures pour un seul échantillon, et le nom de cet échantillon est compris dans le nom du fichier FASTQ. Dans le flux de travail des variants somatiques, quatre fichiers FASTQ sont générés pour chaque échantillon (deux par groupe d'oligonucléotides), deux de la lecture 1 et deux de la lecture 2. Les fichiers FASTQ constituent les principales données d'entrée pour l'alignement.

### Alignement

Au cours de l'étape de l'alignement, l'algorithme de Smith-Waterman par bande aligne les amplifiats provenant de chacun des échantillons sur les séquences d'amplicon définies dans le fichier de manifeste.

L'algorithme de Smith-Waterman par bande effectue des alignements de séquence semi-globale pour déterminer les régions similaires entre deux séquences. Au lieu de comparer l'intégralité de la séquence, l'algorithme de Smith-Waterman compare les segments de toutes les longueurs possibles.

Chaque lecture appariée est évaluée en fonction de son alignement sur les séquences de sonde correspondantes.

- La lecture 1 est évaluée par rapport au complément inverse des oligos locus spécifiques en aval (DLSO).
- La lecture 2 est évaluée par rapport aux oligos locus spécifiques en amont (ULSO).
- Si le début d'une séquence de lecture correspond à une séquence de sonde ne présentant pas plus de trois différences (mésappariements ou décalages attribuables aux principaux indels), la longueur totale de la lecture est alors alignée sur la séquence d'amplicon cible pour cette séquence.
- Les indels dans les DLSO et ULSO ne sont pas observés étant donné la chimie du test.

Les résultats de l'alignement sont enregistrés dans les fichiers d'alignement (fichiers BAM). Les lectures sont filtrés en fonction des résultats de l'alignement basés sur les taux de mésappariements par rapport à la région d'intérêt ou à l'amplicon complet, selon la longueur de l'amplicon. Les lectures filtrées sont notées dans les fichiers d'alignement, mais sont marquées comme étant non alignées et ne sont pas utilisées pour l'appel des variants.

### Appel des variants

L'appel des variants (Pisces) est conçu pour générer des appels de SNV, MNV et de variants d'indels provenant des bibliothèques préparées pour l'instrument.

### Rapports et fichiers de sortie supplémentaires

Les modules d'analyse des variants produisent des rapports en format PDF et sous la forme de fichiers de texte séparé par des tabulations (\*.txt) qui contiennent les indicateurs, comme la profondeur de séquençage et le nombre de variants. Les modules produisent aussi des fichiers de sortie, comme des fichiers VCF et des fichiers gVCF (genome Variant Call Format).

### Procédures de contrôle qualité

Le logiciel MiSeqDx évalue chaque analyse, échantillon et définition des bases par rapport aux indicateurs de contrôle de la qualité. Les contrôles positifs et négatifs inclus dans la préparation des bibliothèques doivent aussi faire l'objet d'une évaluation. Évaluez comme suit les résultats des contrôles de séquençage :

- Si un contrôle sans modèle génère un taux d'appel supérieur à 10 %, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon, un enregistrement incorrect des primers d'index ou une contamination dans le contrôle sans modèle. Le test est considéré comme un échec et l'ensemble du protocole doit être répété, et ce, à partir de la préparation de la bibliothèque.

- L'échantillon de contrôle positif doit générer le résultat attendu. Si le contrôle positif génère un résultat différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'index. L'ensemble du protocole doit être répété, et ce, à partir de la préparation de la librairie.

## Caractéristiques de performance

Les études germinales ont utilisé les réactifs du test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx ou de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx pour la préparation des librairies. Ces deux trousse utilisent les mêmes réactifs de préparation de librairies et n'ont qu'une différence dans le flux de travail : le nombre de cycles d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (respectivement, 25 et 28). Le nombre supplémentaire de cycles PCR permet de réduire l'entrée d'ADN dans le cas de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx (50 ng) par rapport au test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx (250 ng), comme le démontre l'étude d'entrée d'ADN à l'aide de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx. Les librairies préparées avec le test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx ont été séquencées selon les réactifs de séquençage fournis dans la trousse. Les librairies préparées avec la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx ont été séquencées avec la trousse de réactifs MiSeqDx v3. Les derniers réactifs de séquençage ont un rendement accru par rapport à ceux du test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx.

Les études somatiques ont été menées à l'aide de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx et de la trousse de réactifs MiSeqDx v3.

Toutes les études ont été effectuées sur MiSeqDx. Le flux de travail germinale ou le flux somatique, décrit pour la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx aux fins de la préparation des librairies en vue du séquençage, a été suivi d'une analyse effectuée respectivement au moyen du module des variants germinaux ou du module des variants somatiques, sauf deux exceptions. Les études utilisant un gène (performance du flux de travail germinale; test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx) ou deux gènes (performance du flux de travail somatique) comme panel de mutation représentatif sont fondées sur des flux de travail et des modules d'analyse spécifiques au test.

Remarque : Le contenu génomique de l'amplicon est résumé par rapport au brin génomique qui est séquencé. Pour les amplicons conçus par rapport au brin négatif, le contenu du génome de référence est le complément inverse (par exemple, les régions PolyA sur les amplicons à brin négatif correspondent aux régions PolyT sur le génome de référence).

### Définitions des calculs utilisés dans les caractéristiques de performance

- 1 La concordance positive en pour cent (CPP) correspond à la proportion de loci classifiés comme étant des variants par une méthode de référence qui ont été correctement analysés par le test.
  - $(\text{nombre de loci variants correctement analysés par le test}) / (\text{nombre total de loci variants})$   
Les loci variants analysés par le test et qui concordent avec la méthode de référence sont des vrais positifs (TP). Les loci variants analysés comme des appels de référence ou des appels de variant différents par le test sont des faux négatifs (FN).
- 2 La concordance négative en pour cent (CNP) est calculée comme correspondant à la proportion de loci classifiés comme étant de type sauvage par une méthode de référence qui ont été correctement analysés par le test.
  - $(\text{nombre de loci de type sauvage correctement analysés par le test}) / (\text{nombre total de loci de type sauvage})$   
Les loci de type sauvage analysés par le test et qui concordent avec la méthode de référence sont des vrais négatifs (TN). Les loci de type sauvage analysés comme étant des variants par le test sont des faux positifs (FP).
- 3 Le pourcentage global de concordance (PGC) correspond à la proportion de loci correctement analysés par le test relativement à une méthode de référence.
  - $((\text{nombre de loci variants correctement analysés par le test}) + (\text{nombre de loci de type sauvage correctement analysés par le test})) / ((\text{nombre total de loci variants}) + (\text{nombre total de loci de type sauvage}))$

- 4 Les calculs de la CPP, de la CNP et du PGC ne comprennent pas les absences d'appels (loci variants ou loci de référence qui ne passent pas un ou plusieurs des filtres de qualité). Deux études comprennent spécifiquement les absences d'appels dans leur paramètre de « % d'appels exacts », et cette inclusion des absences d'appels est notée pour les tables applicables.
- 5 Le débit d'appel est calculé comme correspondant au nombre total de loci qui passent les filtres, divisé par le nombre total de positions séquencées pour les chromosomes 1 à 22; les chromosomes X et Y étant exclus. Ce paramètre ne tient pas compte de la concordance des appels avec la méthode de référence.

Pour les caractéristiques de performance liées aux facteurs pré-analytiques (p. ex., méthodes d'extraction ou entrée d'ADN), reportez-vous à la notice d'accompagnement de la méthode de préparation des bibliothèques applicable.

### Indexage de l'échantillon

Les primers d'indexage de l'échantillon, ajoutés pendant la préparation des bibliothèques, attribuent une séquence unique à chaque échantillon d'ADN, ce qui permet le regroupement de multiples échantillons dans une seule analyse de séquençage. L'indexage de l'échantillon est utilisé pour les flux de travail germinaux et somatiques.

Un total de 96 index d'échantillons a été analysé à l'aide d'un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 12 588 bases par brin sur les 23 chromosomes humains pour vérifier la capacité du test à faire systématiquement un appel de génotypage pour un échantillon donné sur différentes combinaisons de primers d'indexage. Le chromosome Y ne contient pas de région de fiabilité et n'a pas été évalué. Huit échantillons uniques ont été analysés avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexage par échantillon. Les résultats d'analyse des échantillons provenant du module d'analyse des variants germinaux ont été comparés aux données du Platinum Genomes version 2016-01. La CPP (SNV et indels) a dépassé 97 % (les appels vrais positifs étaient d'au moins 70 pour les SNV, de 38 pour les insertions et de 36 pour les délétions) et la CNP était de 100 % (au moins 23 440 positions de référence par combinaison d'index) pour chacune des 96 combinaisons d'index. De façon indépendante, un seul index a été analysé pour vérifier si la chimie de séquençage de la trousse de réactifs MiSeqDx v3 peut soutenir moins de huit échantillons (la chimie précédente de la trousse universelle MiSeqDx 1.0 était limitée à un minimum de huit échantillons). L'index avait une CPP de 98,9 % (180/182) pour les SNV, de 100 % (38/38) pour les insertions et de 100 % (46/46) pour les délétions. La CNP était de 100 % (23 856/23 856).

Douze réplicats (24 bibliothèques) d'un échantillon ont été analysés pour mesurer la précision de l'index avec des variants somatiques, à des fréquences de 0,05 à 0,10, en utilisant le module de variants somatiques (deux combinaisons d'index par réplicat sont utilisés pour produire des appels de variants somatiques). La CPP était de 100 % pour les SNV (64/64), les insertions (11/11) et les délétions (19/19). La CNP était de 100 % (au moins 11 590 positions de référence par combinaison d'index) pour toutes les combinaisons d'index.

### Contamination par transfert entre échantillons

Le flux de travail de l'instrument MiSeqDx comporte la préparation de bibliothèques et le séquençage de multiples échantillons et contrôles en même temps. L'étude sur la contamination par transfert entre échantillons a été réalisée pour évaluer si les résultats faux positifs, attribuables à la contamination par transfert entre deux puits au cours de la préparation de bibliothèques d'échantillons et entre deux analyses de séquençage consécutives, ont une incidence sur les résultats des tests. Des variants somatiques ont été utilisés, puisqu'ils peuvent être détectés à une fréquence d'allèle moins élevée que les variants germinaux.

Les échantillons étaient composés de quatre échantillons d'ADN génomique de lignées cellulaires, qui contenaient chacun des mutations différentes dans un test représentatif de deux gènes. Les échantillons étaient tels qu'une mutation à une certaine position dans l'un d'eux aura une séquence de référence (type sauvage) dans les autres.

La contamination par transfert d'un puits à un autre est définie comme un type d'échec potentiellement causé par les étapes de traitement manuel (pipetage, erreur entre deux échantillons, etc.). Pour évaluer la contamination entre deux puits, deux analyses d'essai ont été réalisées :

- Une présentation en échiquier d'un échantillon d'ADN génomique (ADNg) à entrée élevée contenant une mutation dans le gène 1 alternant avec un échantillon d'ADNg à faible entrée contenant un mutant dans le gène 2.

- Une présentation en échiquier d'un échantillon d'ADNg à entrée élevée contenant une mutation dans le gène 2 alternant avec un échantillon d'ADNg à faible entrée contenant une mutation dans le gène 1.

Dans chaque analyse, un total de 12 réplicats ont été évalués pour détecter des faux positifs (p. ex., une mutation du gène 1 est détectée dans un puits désigné comme échantillon mutant du gène 2, ou vice versa).

La contamination par transfert d'une analyse à une autre est définie comme un type d'échec potentiellement causé par des résidus d'une analyse de séquençage précédente. Pour déterminer s'il y a contamination par transfert entre analyses de séquençage, deux plaques contenant chacune 11 réplicats d'un échantillon unique d'ADNg à entrée élevée, plus un échantillon vierge, ont été préparées et séquencées consécutivement sur un instrument MiSeqDx et évaluées pour détecter des faux positifs. La première analyse contenait 11 réplicats d'un échantillon mutant du gène 2, plus un échantillon vierge. La seconde analyse contenait 11 réplicats d'un échantillon mutant du gène 1, plus un échantillon vierge. La librairie d'échantillons mutants du gène 2 a été séquencée d'abord, suivie d'une analyse de séquençage subséquente avec la librairie d'échantillons mutants du gène 1, suivie d'une reprise de l'analyse de séquençage avec la librairie d'échantillons mutants du gène 2. Toute mutation du gène 2 observée dans une analyse ne comportant que des mutations du gène 1, ou vice versa, indiquerait une contamination par transfert.

Aucun faux positif (0/24, 0 %) attribuable à la contamination par transfert *d'un puits à un autre* n'a été détecté. Toutes les mutations prévues ont été détectées. Aucun faux positif (0/24, 0 %) attribuable à la contamination par transfert *d'une analyse à une autre* n'a été détecté. Toutes les mutations prévues ont été détectées. Aucun faux positif (0/48, 0 %) attribuable à la contamination par transfert *totale* (d'un puits à un autre et d'une analyse à une autre) n'a été détecté.

### Caractéristiques de performance du flux de travail germinale

Les études décrites dans le présent document ont utilisé le module des variants germinaux pour l'analyse des données de séquençage, à l'exception des études reposant sur un panel à un gène, dans les cas où un module spécifique au test était utilisé.

### Précision

L'étude suivante a été menée pour évaluer la précision de l'instrument MiSeqDx utilisé avec la trousse de réactifs MiSeqDx v3 et de l'ADN de haute qualité. Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents au moyen de 150 amplicons. Le chromosome Y ne contient pas de région de fiabilité et n'a pas été évalué. Les 12 échantillons uniques utilisés dans cette étude proviennent d'une même famille (deux parents et 10 enfants) et ont été fréquemment séquencés par différents laboratoires au moyen de plusieurs méthodes de séquençage. Il y a cinq échantillons de sujets féminins et sept échantillons de sujets masculins. Chacun des échantillons a été testé en double. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les délétions en comparant les données de l'étude à une base de données de référence bien caractérisée. La séquence de la base de données de référence (Platinum Genomes, version 2016-01) a été obtenue à partir de la combinaison de plusieurs méthodes de séquençage, de données accessibles au public et de données sur l'hérédité. Les régions génomiques de fiabilité ont été définies sur la base de cette méthode de référence, à moins d'indication contraire. Au total, les échantillons ont été analysés 8 fois. Les tableaux illustrant la précision des résultats sont fondés sur les données de la première analyse.

Le tableau 1 montre les données de l'étude présentées avec la concordance positive et négative en pour cent, par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée pour le calcul de la concordance positive en pour cent (CPP). Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Étant donné que la méthode de référence ne donne des résultats que pour les variants mononucléotides et les insertions/délétions, les résultats des bases sans variants sont comparés à la séquence de référence du génome humain version hg19 pour le calcul de la concordance négative en pour cent (CNP).

Tableau 1 Concordance des résultats des définitions des bases sur l'instrument MiSeqDx, par échantillon

Échantillon	Taux d'appel moyen	Nombre total de variants	Nombre total de variants TP	Nombre total de variants FN	Nombre total d'absences d'appel	Nombre total d'appels TN	CPP	CNP	PGC
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24 024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23 856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24 054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

Le test représentatif comprenait 150 amplicons conçus pour couvrir un contenu génomique varié. La teneur en GC des amplicons allait de 26 % à 87 %. Les amplicons comprenaient également diverses répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données ont été compilées par amplicon (tableau 2) de façon à déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels exacts. Le pourcentage d'appels exacts se rapporte aux appels de variants et aux appels de référence et est inférieur à 100 % en cas d'appels inexacts ou d'absences d'appel. Les absences d'appel se produisent lorsque l'appel des variants ne passe pas un ou plusieurs filtres (p. ex., en raison d'une couverture insuffisante).

Des huit variants FN indiqués dans le tableau 2, sept sont attribuables à l'insertion d'une pb à l'amplicon 111, qui comportait également un homopolymère PolyA et une teneur en GC de 0,29. L'autre FN (appel inexact) était attribuable à un SNV hétérozygote attendu, à l'amplicon 125, à teneur en GC de 0,68, ayant entraîné une définition de variant homozygote. La fréquence du variant SNV était de 0,71, ce qui est supérieur au seuil de 0,70 pour la classification à titre de variant homozygote. L'amplicon ayant le pourcentage d'appels exacts le moins élevé (98,2 %) est l'amplicon 17, pour lequel il y a eu 40 absences d'appel, qui comportait des répétitions AT et une teneur en GC de 27 %.

Tableau 2 Précision au niveau de l'amplicon pour l'instrument MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Nombre total d'appels exacts	Nombre total d'appels inexacts	Nombre total d'absences d'appel	% d'appels exacts
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2 232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1 896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2 184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2 208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1 944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1 680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	2 112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2 160	0	0	100

9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1 920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	s. o.	0,65	1 944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1 800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2 112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2 088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2 184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	s. o.	0,43	2 232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1 752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2 192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	s. o.	0,43	1 992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1 680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	2 112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1 774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1 872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2 328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	s. o.	0,29	1 872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1 488	0	0	100



26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1 656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1 488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	s. o.	0,78	1 800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2 016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	s. o.	0,39	1 536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1 992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1 608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2 184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1 800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	2 448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2 208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2 244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2 352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2 280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2 064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2 256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2 184	0	0	100
43	7	22202176	22202148	73	73	s. o.	0,44	1 752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2 112	0	0	100

45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2 088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2 040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2 160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2 184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	s. o.	0,31	1 584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2 232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	s. o.	0,42	1 992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2 113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1 608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2 352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1 560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	s. o.	0,49	2 304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1 992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2 328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1 872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2 184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1 896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2 160	0	0	100

63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2 280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2 102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	s. o.	0,49	1 920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	s. o.	0,51	1 944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	s. o.	0,45	2 304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1 680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	s. o.	0,65	2 400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1 488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	s. o.	0,59	2 448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1 752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	s. o.	0,42	2 040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2 184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2 040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	2 040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2 040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2 016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2 232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	s. o.	0,49	1 944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1 704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2 280	0	0	100

83	13	24167504	24167576	73	73	s. o.	0,52	1 752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2 112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2 136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1 848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1 608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	s. o.	0,25	1 992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1 727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1 944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2 184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1 584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2 256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2 304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1 632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2 232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2 280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1 704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	s. o.	0,36	2 184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1 680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	s. o.	0,27	1 512	0	0	100

102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2 280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2 088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2 496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2 184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2 136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2 088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2 184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2 232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2 136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1 944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2 184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2 208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1 887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2 064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2 016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1 608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	s. o.	0,37	2 184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1 656	0	0	100

120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1 800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1 944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2 040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	s. o.	0,48	1 560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	s. o.	0,59	2 376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	s. o.	0,68	1 775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	s. o.	0,64	1 680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	s. o.	0,61	2 256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1 968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1 824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1 680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2 424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1 608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2 112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2 088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1 584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2 352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2 088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1 656	0	0	100

139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2 160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2 400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	s. o.	0,68	2 328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2 328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	s. o.	0,6	2 376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2 208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1 656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1 656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	s. o.	0,52	1 704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	s. o.	0,55	0	0	0	s. o.
149	Y	2655519	2655609	91	0	s. o.	0,48	0	0	0	s. o.
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	s. o.

Les variants pour lesquels il n'y a pas eu d'appel sont présentés dans le tableau 3. Les filtres ayant causé l'absence d'appel sont énumérés dans le tableau. L'insertion de l'amplicon 111 a été filtrée neuf fois sur 16. Dans les sept autres cas, elle a entraîné un appel de référence, et donc un FN.

**Tableau 3** Résumé des absences d'appel de variant

N° d'amplicon	Chr:Pos	Variant	Contenu de l'amplicon	Filtre	Variants manqués	Variants prévus	FN
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9 : filtre de répétitions. Le variant est filtré lorsque sa séquence se retrouve, en totalité ou en partie, à répétition dans le génome de référence adjacent à la position du variant. Il faut au moins neuf répétitions dans la référence et seules les répétitions d'une longueur d'au plus 5 pb sont prises en compte.

Les résultats de séquençage pour l'échantillon NA12878 ont été comparés à un génotype d'une grande fiabilité établi pour NA12878 par le National Institutes of Standards and Technology (NIST, Institut national des normes et de la technologie) (v.2.19). Parmi les 150 amplicons, 92 étaient pleinement compris dans les régions génomiques de grande fiabilité, 41 montraient des chevauchements partiels et 17 ne comportaient aucun chevauchement avec la séquence du NIST. Il en a résulté 10 000 coordonnées par réplicat, pour comparaison. Les définitions des bases sans variants ont été comparées à la séquence du génome humain de référence version 19. Les résultats sur la précision sont affichés dans le tableau 4.

**Tableau 4** Concordance des résultats des définitions des bases sur l'instrument MiSeqDx pour l'échantillon NA12878 avec la base de données du NIST

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux d'appel moyen	Nombre total de variants TP	Nombre total de variants FN	Nombre total d'appels TN	Nombre total d'appels FP	CPP	CNP	PGC
NA12878	133	99,98	208	0	19 380	0	100	100	100



Les échantillons ont également été analysés à la recherche de petites insertions et délétions (indels) (tableau 5). Dans certains cas, l'indel se retrouvait dans deux échantillons ou plus, comme le montre la colonne « Nbre total de réplicats de l'échantillon avec indel ». Les résultats des deux réplicats des 12 échantillons valides sont affichés dans le tableau 5. Il y avait au total 71 indels dont la taille variait de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les délétions. 69 indels ont été détectés les deux fois, avec une concordance positive de 100 %. L'une des délétions (amplicon 64; délétion de 2 pb (chr10 55892600 TAC > T) n'a pas entraîné un appel exact parce que chacun des variants a généré une absence d'appel attribuable au filtre5, R5x9); par conséquent, il n'a pas été possible de calculer la CCP, qui exclut les absences d'appel. Un autre indel, soit l'insertion d'une pb (chr17 39589692 C>CA) à l'amplicon 111, n'a pas non plus entraîné un appel exact parce que neuf variants ont généré une absence d'appel attribuable au filtre R5x9 et que sept variants étaient des faux négatifs (FN).

Tableau 5 Résumé de la détection des indels à l'aide de l'instrument MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel de l'amplicon	Indel	Nbre total de réplicats de l'échantillon avec indel	Nombre d'absences d'appel	Nombre total d'appels d'indels inexacts	Nombre total d'appels d'indels exacts	CCP
1	1	36450544	93	délétion de 25 pb	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	délétion de 3 pb	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	insertion de 23 pb	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	délétion de 17 pb	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	insertion de 5 pb	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	insertion de 3 pb	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	insertion de 7 pb	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	délétion de 6 pb	TTATCTC>T	6	0	0	6	100

13	2	200796749	87	insertion de 5 pb	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	insertion de 12 pb	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	insertion de 2 pb	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	délétion de 23 pb	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	insertion de 9 pb	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	délétion de 1 pb	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	délétion de 8 pb	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	insertion de 11 pb	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	délétion de 4 pb	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	insertion de 8 pb	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	délétion de 21 pb	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	délétion de 3 pb	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	délétion de 25 pb	CTTTCACTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	délétion de 23 pb	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100

44	7	66276142	88	insertion de 1 pb	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	délétion de 4 pb	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	insertion de 1 pb	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	délétion de 4 pb	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	délétion de 11 pb	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	délétion de 1 pb	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	insertion de 4 pb	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	insertion de 4 pb	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	délétion de 21 pb	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	délétion de 3 pb	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	délétion de 16 pb	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	délétion de 2 pb	TAC>T	10	10	0	0	s. o.
68	11	30177690	70	insertion de 2 pb	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	insertion de 8 pb	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100

75	11	118406328	85	délétion de 8 pb	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	délétion de 2 pb	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	insertion de 21 pb	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	insertion de 19 pb	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	insertion de 4 pb	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	délétion de 20 pb	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	délétion de 22 pb	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	insertion de 4 pb	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	délétion de 16 pb	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	délétion de 5 pb	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	délétion de 6 pb	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	délétion de 25 pb	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	insertion de 3 pb	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	insertion de 4 pb	G>GCTAC	8	0	0	8	100

105	16	85706416	91	délétion de 7 pb	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	délétion de 1 pb	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	insertion de 18 pb	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	insertion de 4 pb	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	insertion de 1 pb	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	insertion de 24 pb	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	délétion de 4 pb	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	délétion de 12 pb	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	insertion de 22 pb	T>TGTATCTTAGCAAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	insertion de 3 pb	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	délétion de 2 pb	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	délétion de 15 pb	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	insertion de 5 pb	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	insertion de 11 pb	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100

134	20	62690925	87	délétion de 16 pb	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	insertion de 11 pb	G>GATAAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	délétion de 21 pb	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	délétion de 5 pb	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	insertion de 6 pb	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	insertion de 5 pb	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	délétion de 10 pb	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Reproductibilité

Deux études ont été menées pour évaluer l'exactitude de l'instrument MiSeqDx à partir de lignées cellulaires (études 1 et 2) ou de sang déleucocyté enrichi de lignées cellulaires (étude 2). L'étude 1 a été menée sur plusieurs instruments et l'étude 2, sur plusieurs sites.

### Étude 1

La reproductibilité des résultats obtenus avec l'instrument MiSeqDx a été déterminée au moyen de deux instruments, par deux opérateurs, avec deux lots de réactifs, dans huit analyses au total. Les tests, échantillons et méthodes de référence représentatifs étaient les mêmes que ceux qui ont été utilisés pour l'étude de précision.

Les résultats sont présentés par amplicon et par instrument (tableau 6) pour illustrer la reproductibilité des appels d'un instrument à l'autre. Le pourcentage d'appels exacts comprend les appels inexacts et les absences d'appel (l'appel de variants ne passe pas un ou plusieurs filtres). Les instruments ont généré des résultats semblables pour ce qui est des absences d'appel et des appels inexacts, selon les amplicons.

Tableau 6 Résultats de l'étude de reproductibilité d'un instrument à l'autre pour l'instrument MiSeqDx (au niveau de l'amplicon)

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nbre total d'appels exacts	Nbre total d'appels inexacts	Nbre total d'absences d'appel	Nbre total d'appels exacts	Nbre total d'appels inexacts	Nbre total d'absences d'appel
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8 928	0	0	8 928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7 584	0	0	7 584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8 736	0	0	8 736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8 832	0	0	8 832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7 776	0	0	7 776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6 720	0	0	6 720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	8 448	0	0	8 448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8 640	0	0	8 640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7 680	0	0	7 680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	s. o.	0,65	7 775	1	0	7 775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7 200	0	0	7 200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8 448	0	0	8 448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8 352	0	0	8 352	0	0

14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8 736	0	0	8 736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	s. o.	0,43	8 928	0	0	8 928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7 008	0	0	7 008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8 761	0	167	8 760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	s. o.	0,43	7 968	0	0	7 968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6 720	0	0	6 720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	8 448	0	0	8 448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7 096	0	8	7 096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7 488	0	0	7 488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9 312	0	0	9 312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	s. o.	0,29	7 488	0	0	7 488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5 952	0	0	5 952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6 624	0	0	6 624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5 952	0	0	5 952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	s. o.	0,78	7 200	0	0	7 200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	8 064	0	0	8 064	0	0



30	5	41069808	41069871	64	64	s. o.	0,39	6 144	0	0	6 144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7 968	0	0	7 968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6 432	0	0	6 432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8 736	0	0	8 736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7 200	0	0	7 200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9 792	0	0	9 792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8 832	0	0	8 832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8 979	0	45	8 979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	9 408	0	0	9 408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9 120	0	0	9 120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8 256	0	0	8 256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9 024	0	0	9 024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8 736	0	0	8 736	0	0
43	7	22202176	22202148	73	73	s. o.	0,44	7 008	0	0	7 008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8 448	0	0	8 448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8 352	0	0	8 352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8 160	0	0	8 160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8 550	0	90	8 550	0	90

48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8 736	0	0	8 736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	s. o.	0,31	6 336	0	0	6 336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8 928	0	0	8 928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	s. o.	0,42	7 968	0	0	7 968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8 452	0	92	8 449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6 432	0	0	6 432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9 408	0	0	9 408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6 240	0	0	6 240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	s. o.	0,49	9 216	0	0	9 216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7 968	0	0	7 968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9 312	0	0	9 312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7 488	0	0	7 488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8 644	1	91	8 644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7 584	0	0	7 584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8 640	0	0	8 640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9 120	0	0	9 120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8 408	0	40	8 407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	s. o.	0,49	7 680	0	0	7 680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	s. o.	0,51	7 776	0	0	7 776	0	0

67	11	8159816	8159912	97	96	s. o.	0,45	9 216	0	0	9 216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6 720	0	0	6 720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	s. o.	0,65	9 600	0	0	9 600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5 952	0	0	5 952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	s. o.	0,59	9 792	0	0	9 792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7 008	0	0	7 008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	s. o.	0,42	8 160	0	0	8 160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8 736	0	0	8 736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8 160	0	0	8 160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	8 160	0	0	8 160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8 160	0	0	8 160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8 064	0	0	8 064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8 928	0	0	8 928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	s. o.	0,49	7 776	0	0	7 776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6 816	0	0	6 816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9 117	3	0	9 119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	s. o.	0,52	7 008	0	0	7 008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8 448	0	0	8 448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8 544	0	0	8 544	0	0

86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7 392	0	0	7 392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6 432	0	0	6 432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	s. o.	0,25	7 968	0	0	7 968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6 830	0	82	6 835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7 776	0	0	7 776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8 736	0	0	8 736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6 336	0	0	6 336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9 024	0	0	9 024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9 216	0	0	9 216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6 528	0	0	6 528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8 928	0	0	8 926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9 120	0	0	9 120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6 816	0	0	6 816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	s. o.	0,36	8 736	0	0	8 736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6 720	0	0	6 720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	s. o.	0,27	6 048	0	0	6 048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9 120	0	0	9 120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8 352	0	0	8 352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9 984	0	0	9 984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8 736	0	0	8 736	0	0

106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8 544	0	0	8 544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8 347	0	5	8 347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8 736	0	0	8 736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8 928	0	0	8 928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8 544	0	0	8 544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7 776	7	89	7 777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8 736	0	0	8 736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	8 832	0	0	8 832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7 546	0	38	7 547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8 256	0	0	8 256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8 064	0	0	8 064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6 432	0	0	6 432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	s. o.	0,37	8 736	0	0	8 736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6 624	0	0	6 624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7 200	0	0	7 200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7 776	0	0	7 776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8 160	0	0	8 160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	s. o.	0,48	6 240	0	0	6 240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	s. o.	0,59	9 504	0	0	9 504	0	0

125	19	18121418	18121491	74	74	s. o.	0,68	7 102	2	0	7 104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	s. o.	0,64	6 718	2	0	6 718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	s. o.	0,61	9 024	0	0	9 024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7 872	0	0	7 872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7 296	0	0	7 296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	6 720	0	0	6 720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9 696	0	0	9 696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6 432	0	0	6 432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8 360	0	88	8 360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8 352	0	0	8 352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6 336	0	0	6 336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9 408	0	0	9 408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8 352	0	0	8 352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6 603	0	21	6 601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8 640	0	0	8 640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9 600	0	0	9 600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	s. o.	0,68	9 312	0	0	9 312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9 312	0	0	9 312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	s. o.	0,6	9 504	0	0	9 504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8 832	0	0	8 832	0	0

145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6 624	0	0	6 624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6 624	0	0	6 624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	s. o.	0,52	6 816	0	0	6 816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	s. o.	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	s. o.	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Les résultats de l'étude de reproductibilité ont été analysés par opérateur, en fonction de la fréquence des variants (tableau 7). L'analyse a démontré que la fréquence des variants concorde entre les deux opérateurs. La fréquence moyenne des variants +/- un écart-type de 1 a été observée.

**Tableau 7** Comparaison des résultats de l'instrument MiSeqDx, par opérateur

Plage de fréquence des variants	Nbre de variants uniques	Nbre total de variants analysés, opérateur 1	Nbre total de variants analysés, opérateur 2	Fréquence moyenne des variants (écart-type), opérateur 1	Fréquence moyenne des variants (écart-type), opérateur 2
Homozygotes (0,70 à 1,00)	2 424	2 424	2 422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Hétérozygotes (0,20 à 0,70)	8 240	8 132	8 128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Les résultats des huit analyses de l'étude de reproductibilité ont été regroupés par échantillon (tableau 8). La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions). Les positions de référence sont exclues. L'analyse a montré que les résultats des variants étaient reproductibles pour tous les échantillons.

**Tableau 8** Concordance des résultats des définitions des bases sur l'instrument MiSeqDx, par échantillon

Échantillon	SNV				Insertions				Délétions			
	Nbre Total	Total des TP	Total des FP	Total des FN	Nbre Total	Total des TP	Total des FP	Total des FN	Nbre Total	Total des TP	Total des FP	Total des FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1 456	1 456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1 072	1 071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1 248	1 247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1 088	1 087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1 088	1 088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1 200	1 189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1 104	1 102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1 056	1 054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1 168	1 168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Les données des huit analyses de cette étude de reproductibilité confirment que l'instrument MiSeqDx peut séquencer ce qui suit de façon uniforme :

- Teneur en GC  $\geq$  19 % (toutes les bases définies dans 192 des 192 amplicons séquencés ayant une teneur en GC de 19 % ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 1,1 %)
- Teneur en GC  $\leq$  78 % (toutes les bases définies dans 192 des 192 amplicons séquencés ayant une teneur en GC de 78 % ont été appelées correctement et il n'y a eu aucune absence d'appel)
- Longueurs de PolyA  $\leq$  8 (la répétition PolyA de huit nucléotides a été appelée correctement dans 192 des 192 amplicons séquencés contenant PolyA = 8)



- Longueurs de PolyT  $\leq 10$  (la répétition PolyT de dix nucléotides a été appelée correctement dans 192 des 192 amplicons séquencés contenant PolyT = 10)
- Longueurs de PolyG  $\leq 7$  (la répétition PolyG de sept nucléotides a été appelée correctement dans 192 des 192 amplicons séquencés contenant PolyG = 7)
- Longueurs de PolyC  $\leq 6$  (la répétition PolyC de six nucléotides a été appelée correctement dans 576 des 576 amplicons séquencés contenant PolyC = 6)
- Longueurs de répétition de dinucléotides  $\leq 11 \times$  (toutes les bases définies dans 192 des 192 amplicons séquencés avec une répétition de dinucléotides de  $11 \times$  ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,5 %)
- Longueurs de répétition de trinucléotides  $\leq 5 \times$  (toutes les bases définies dans 192 des 192 amplicons séquencés avec une répétition de trinucléotides de  $5 \times$  ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,5 %)
- Insertions de 24 bases ou moins et délétions de 25 bases ou moins
  - Les insertions de 24 bases ou moins ont été appelées correctement dans 192 des 192 échantillons
  - Les délétions de 25 bases ou moins ont été appelées correctement dans 223 échantillons et on fait l'objet d'un appel inexact dans un des 224 échantillons

## Étude 2

Une étude de reproductibilité entre sites a été effectuée avec un test représentatif, soit le test de la fibrose kystique à 139 variants MiSeqDx d'Illumina, incluant un sous-ensemble de variations du gène *CFTR* pertinentes d'un point de vue clinique analysées avec le logiciel MiSeq Reporter selon le flux de travail de séquençage d'ADN ciblé MiSeqDx (tableau 9). L'étude en aveugle a été réalisée sur trois sites d'essais et a nécessité deux opérateurs sur chaque site. Deux panels bien caractérisés de 46 échantillons chacun ont été analysés par chacun des opérateurs sur chaque site pour un total de 810 appels par site. Les panels contenaient un mélange d'ADN génomique issu des lignées cellulaires ayant des variants connus dans le gène *CFTR*, ainsi que du sang déleucocyté enrichi de lignées cellulaires ayant des variants connus dans le gène *CFTR*. Les échantillons de sang ont été fournis pour permettre l'incorporation des étapes d'extraction utilisées dans la préparation d'ADNg qui sert d'entrée primaire pour le flux de travail du test. Le débit de passage des échantillons, défini comme le nombre d'échantillons passant les indicateurs de contrôle qualité lors de la première tentative, était de 99,88 %. Tous les résultats des tests sont basés sur un test initial.

Tableau 9 Résumé des résultats de l'étude de reproductibilité réalisée avec un test représentatif de la fibrose kystique à 139 variants MiSeqDx

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A > G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C absents	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delITT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	56	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	57	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621 + 1G > T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s. o.	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74 556	2 209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> L'emplacement de type sauvage correspondant au variant N1303K pour un réplicat n'a entraîné aucun appel en raison d'une couverture insuffisante.

<sup>2</sup> Un réplicat des échantillons 5 et 75 avait un débit d'appel de 0 %. Le complément d'enquête indique que des échantillons peuvent ne pas avoir été ajoutés à la plaque d'échantillons avant la préparation de la librairie, car les volumes d'échantillon restants dans les tubes indiquaient qu'aucun volume n'avait été retiré.

<sup>3</sup> Des preuves indiquent que les échantillons 9 et 10 ont été vraisemblablement échangés par l'opérateur avant la préparation de la librairie.

<sup>4</sup> L'emplacement de type sauvage correspondant au variant M1V pour un réplicat de chacun des deux échantillons n'a entraîné aucun appel en raison d'une couverture insuffisante.

### Caractéristiques de performance du flux de travail somatique

Les études décrites dans le présent document ont utilisé le module des variants somatiques pour l'analyse des données de séquençage, à l'exception des études reposant sur un panel à deux gènes, dans les cas où un module spécifique au test était utilisé.

### Précision

Trois études ont été menées pour évaluer l'analyse sur l'instrument MiSeqDx d'ADN extrait d'échantillons FFPE.



## Étude 1

Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents au moyen de 150 amplicons. Le chromosome Y ne contient pas de région de fiabilité et n'a pas été évalué. Les cinq échantillons uniques utilisés dans cette étude proviennent d'une même famille (deux parents et trois enfants) et ont été fréquemment séquencés par différents laboratoires au moyen de plusieurs méthodes de séquençage. Il y a trois échantillons de sujets féminins et deux échantillons de sujets masculins. Tous les échantillons ont été fixés au formol et imprégnés à la paraffine avant l'extraction de l'ADN aux fins de l'étude. L'échantillon GM12877 a été dilué avec l'échantillon GM12878, au niveau de l'ADN, pour créer l'échantillon GM12877-D, afin d'obtenir un jeu de variants dont la fréquence approchait les 5 % et 10 %. Chaque échantillon a été testé en double, sauf l'échantillon GM12877-D, pour lequel il y avait cinq réplicats. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les délétions en comparant les données de l'étude à une base de données de référence bien caractérisée. La séquence de la base de données de référence (Platinum Genomes, version 2016-01) a été obtenue à partir de la combinaison de plusieurs méthodes de séquençage, de données accessibles au public et de données sur l'hérédité. Les régions génomiques de fiabilité ont été définies sur la base de cette méthode de référence, à moins d'indication contraire. Au total, les échantillons ont été analysés huit fois. Les tableaux illustrant la précision des résultats sont fondés sur les données de la première analyse.

Le tableau 10 montre les données de l'étude présentées avec la concordance positive et négative en pour cent, par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée pour le calcul de la concordance positive en pour cent (CPP). Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Étant donné que la méthode de référence ne donne des résultats que pour les variants mononucléotides et les insertions/délétions, les résultats des bases sans variants sont comparés à la séquence de référence du génome humain version hg19 pour le calcul de la concordance négative en pour cent (CNP).

**Tableau 10** Concordance des résultats des définitions des bases de l'instrument MiSeqDx avec les données de référence pour six échantillons bien caractérisés

Échantillon	Taux d'appel moyen	Nombre total de variants	Nombre total de variants TP	Nombre total de variants FN	Nombre total d'appels TN	CPP	CNP	PGC
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D <sup>1</sup>	98,4	675	650	0	57 608	100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>		155	155	0		100	100	100

<sup>1</sup> Variants dont la fréquence est supérieure à 20 %.

<sup>2</sup> Variants dont la fréquence est inférieure à 20 %.

Les 150 amplicons ont été conçus pour couvrir un contenu génomique varié. La teneur en GC des amplicons allait de 26 % à 87 %. Les amplicons comprenaient également diverses répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Six échantillons uniques ont été utilisés dans le cadre du test. Les données ont été compilées par amplicon (tableau 11) de façon à déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels exacts. Le pourcentage d'appels exacts se rapporte aux appels de variants et aux appels de référence et est inférieur à 100 % en cas d'appels inexacts ou d'absences d'appel. Les absences d'appel se produisent lorsque l'appel des variants ne passe pas un ou plusieurs filtres (p. ex., en raison d'une couverture insuffisante). Il n'y a eu aucun appel inexact. Le nombre d'absences d'appel varie considérablement selon les amplicons. La teneur en GC et les interactions nombreuses avec cette dernière sont le principal prédicteur des absences d'appel. 2 040 absences d'appel sur 2 580 (79 %) étaient attribuables au non-respect des exigences de couverture. Les amplicons dont la teneur en GC était supérieure à 78 % ont généré le plus grand nombre d'absences d'appel. Un amplicon représentatif ayant une teneur en GC de 78 % a obtenu au total 675 absences d'appel. Un amplicon représentatif ayant une teneur en GC de 87 % a obtenu au total 1 365 absences d'appel. La couverture peut être accrue en réduisant le nombre d'échantillons chargés sur la Flow Cell, ce qui peut permettre la détection d'amplicons à teneur en GC élevée.

Tableau 11 Précision au niveau de l'amplicon

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Nombre total d'appels exacts	Nombre total d'appels inexacts	Nombre total d'absences d'appel	% d'appels exacts
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1 395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1 185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1 364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1 380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1 215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1 050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	1 320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1 350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1 200	0	0	100

10	2	177016721	177016805	85	81	s. o.	0,65	1 215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1 117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1 320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1 302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1 365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	s. o.	0,43	1 395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1 095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1 349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	s. o.	0,43	1 245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1 050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1 305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1 108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1 170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1 455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	s. o.	0,29	1 169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1 035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	s. o.	0,78	450	0	675	40,0

29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1 260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	s. o.	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1 245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1 005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1 365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1 125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1 530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1 380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1 383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	1 455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1 425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1 290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1 410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1 365	0	0	100
43	7	22202176	22202148	73	73	s. o.	0,44	1 095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1 320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	1 299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1 275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1 350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1 365	0	0	100

49	7	154404519	154404599	81	66	s. o.	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1 395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	s. o.	0,42	1 245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	1 305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1 005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1 470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	s. o.	0,49	1 440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1 242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1 455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1 170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1 365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1 185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1 350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1 425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1 290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	s. o.	0,49	1 200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	s. o.	0,51	1 215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	s. o.	0,45	1 440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1 050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	s. o.	0,65	1 500	0	0	100

70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	s. o.	0,59	1 530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1 095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	s. o.	0,42	1 275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1 365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1 275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	1 275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1 275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1 260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1 395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	s. o.	0,49	1 215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1 065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1 425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	s. o.	0,52	1 095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1 305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1 335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1 155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1 005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	s. o.	0,25	1 245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1 038	0	42	96,1

90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1 215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1 365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1 410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1 440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1 020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1 395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1 425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1 065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	s. o.	0,36	1 365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1 050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	s. o.	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1 425	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1 305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1 560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1 362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1 335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1 303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1 365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1 395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1 335	0	0	100

111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1 215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1 365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1 365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1 175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1 289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1 260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1 005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	s. o.	0,37	1 365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1 035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1 121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1 215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1 275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	s. o.	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	s. o.	0,59	1 478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	s. o.	0,68	1 110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	s. o.	0,64	1 050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	s. o.	0,61	1 410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1 230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1 140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1 050	0	0	100



131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1 515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1 005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1 320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1 305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1 470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1 305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1 029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1 350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1 500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	s. o.	0,68	1 455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1 455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	s. o.	0,6	1 485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1 380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1 035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1 035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	s. o.	0,52	1 065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	s. o.	0,55	0	0	0	s. o.
149	Y	2655519	2655609	91	0	s. o.	0,48	0	0	0	s. o.
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	s. o.

Les variants pour lesquels il n'y a pas eu d'appel sont présentés dans le tableau 12. Les filtres ayant causé l'absence d'appel sont énumérés dans le tableau.

**Tableau 12** Résumé des absences d'appel de variant

N° d'amplicon	Chr:Pos	Variant	Contenu de l'amplicon	Filtre	Variants manqués	Variants prévus
28	5:1882129	T > G	78 % en GC	LowDP <sup>1</sup>	13	
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyA (3), 87 % GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP : faible couverture. Le variant est filtré si la profondeur dans au moins un des regroupements à une position donnée est inférieure à 900.

<sup>2</sup> R3x6 : filtre de répétitions. Le variant est filtré lorsque sa séquence se retrouve, en totalité ou en partie, à répétition dans le génome de référence adjacent à la position du variant. Il faut au moins six répétitions dans la référence et seules les répétitions d'une longueur d'au plus 3 pb sont prises en compte.

Les résultats de séquençage pour l'échantillon ont été comparés à un génotype d'une grande fiabilité établi pour NA12878 par le National Institutes of Standards and Technology (NIST, Institut national des normes et de la technologie) (v.2.19). Parmi les 150 amplicons, 92 étaient pleinement compris dans les régions génomiques de grande fiabilité, 41 montraient des chevauchements partiels et 17 ne comportaient aucun chevauchement avec la séquence du NIST. Il en a résulté 10 000 coordonnées par réplicat, pour comparaison. Les définitions des bases sans variant ont été comparées à la séquence du génome humain de référence version hg19. Les résultats sur la précision sont affichés dans le tableau 13.

**Tableau 13** Concordance des résultats des définitions des bases de l'instrument MiSeqDx avec les données de référence du NIST pour l'échantillon GM12878

Échantillon	Nbre d'amplicons	Taux d'appel moyen	Nbre total d'appels de variants TP	Nbre total d'appels de variants FN	Nombre total d'appels TN	Nombre total d'appels FP	CPP	CNP	PGC
GM12878	150	98,43	206	0	19 231	0	100	100	100

Les cinq échantillons non dilués ont également été analysés à la recherche de petites insertions et délétions (indels) (tableau 14). Dans certains cas, l'indel se retrouvait dans deux échantillons ou plus, comme le montre la colonne « Nbre total de répliquats de l'échantillon avec indel ». Les résultats des deux répliquats des cinq échantillons valides sont affichés dans le tableau 14. Il y avait au total 71 indels dont la taille variait de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les délétions. 68 indels ont été détectés les deux fois, avec une concordance positive en pour cent de 1. Trois insertions et délétions n'ont eu aucun appel exact parce que chacun des variants en question n'a entraîné aucun appel en raison du filtre R3x6. Par conséquent, il n'a pas été possible de calculer la CCP, qui exclut les absences d'appel. Les trois variants correspondaient à une délétion de 1 pb (chr8 24811064 AG>A), une délétion de 2 pb (chr10 55892600 TAC>T) et une insertion de 1 pb (chr17 39589692 C>CA).

Tableau 14 Résumé de la détection des indels à l'aide de l'instrument MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel de l'amplicon	Indel	Nbre total de répliquats de l'échantillon avec indel	Nombre d'absences d'appel	Nombre total d'appels d'indels inexacts	Nombre total d'appels d'indels exacts	CPP
1	1	36450544	93	délétion de 25 pb	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	délétion de 3 pb	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	insertion de 23 pb	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	délétion de 17 pb	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	insertion de 5 pb	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	insertion de 3 pb	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	insertion de 7 pb	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	délétion de 6 pb	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	insertion de 5 pb	T>TTAAAA	15	0	0	15	100

14	2	212245090	91	insertion de 12 pb	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	insertion de 2 pb	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	délétion de 23 pb	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	insertion de 9 pb	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	délétion de 1 pb	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	délétion de 8 pb	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	insertion de 11 pb	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	délétion de 4 pb	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	insertion de 8 pb	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	délétion de 21 pb	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	délétion de 3 pb	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	délétion de 25 pb	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	délétion de 23 pb	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	insertion de 1 pb	C>CT	13	0	0	13	100

46	7	110939983	85	délétion de 4 pb	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	insertion de 1 pb	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	délétion de 4 pb	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	délétion de 11 pb	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	délétion de 1 pb	AG>A	15	15	0	0	s. o.
53	8	76518677	67	insertion de 4 pb	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	insertion de 4 pb	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	délétion de 21 pb	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	délétion de 3 pb	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	délétion de 16 pb	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	délétion de 2 pb	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	insertion de 2 pb	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	insertion de 8 pb	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	délétion de 8 pb	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100

76	11	120357842	85	délétion de 2 pb	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	insertion de 21 pb	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	insertion de 19 pb	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	insertion de 4 pb	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	délétion de 20 pb	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	délétion de 22 pb	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	insertion de 4 pb	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	délétion de 16 pb	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	délétion de 5 pb	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	délétion de 6 pb	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	délétion de 25 pb	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	insertion de 3 pb	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	insertion de 4 pb	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	délétion de 7 pb	ATTATTC>A	11	0	0	11	100

107	17	3594276	87	délétion de 1 pb	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	insertion de 18 pb	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	insertion de 4 pb	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	insertion de 1 pb	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	insertion de 24 pb	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	délétion de 4 pb	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	délétion de 12 pb	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	insertion de 22 pb	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	insertion de 3 pb	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	délétion de 2 pb	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	délétion de 15 pb	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	insertion de 5 pb	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	insertion de 11 pb	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	délétion de 16 pb	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100



135	21	30300873	66	insertion de 11 pb	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	délétion de 21 pb	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	délétion de 5 pb	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	insertion de 6 pb	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	insertion de 5 pb	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	délétion de 10 pb	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## Étude 2

Cette étude portait sur des échantillons de tissus FFPE envahis par le cancer colorectal et un test représentatif à deux gènes comparé aux données de la méthode de référence, soit le séquençage bidirectionnel Sanger (la méthode Sanger). Des 1 183 sujets de l'étude, 441 avaient des résultats valides selon la méthode Sanger et le test représentatif. Au niveau du sujet (tableau 15), 230 des 441 sujets étaient positifs selon la méthode Sanger (mutation détectée par la méthode Sanger). De ces derniers, 227 étaient positifs selon le test représentatif. Les 211 sujets restants sur 441 étaient négatifs selon la méthode Sanger (aucune mutation détectée par la méthode Sanger). De ces derniers, 206 étaient négatifs selon le test représentatif. Cela a généré une concordance positive en pour cent (CPP) de 98,7 % et une concordance négative en pour cent (CNP) de 97,6 % (tableau 15).

Tableau 15 Concordance positive et négative en pour cent, au niveau des sujets

Test représentatif	Sanger		Total
	Positif	Négatif	
Positif	227 <sup>1</sup>	5	232
Négatif	3 <sup>2</sup>	206	209
Total	230	211	441

## Résumé de la performance

Statistique de concordance	Estimation ponctuelle	IC exact à 95 %
CPP	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
CNP	206/211 = 97,6%	[94,6 %, 99,2 %]

<sup>1</sup> Il y a eu 224 concordances parfaites pour les résultats d'un même sujet, au niveau de l'ensemble des mutations. Pour deux sujets, l'instrument MiSeqDx a détecté la mutation détectée par la méthode Sanger, ainsi qu'une mutation supplémentaire; pour un sujet, l'instrument MiSeqDx et la méthode Sanger ont détecté des mutations différentes.

<sup>2</sup> Pour l'un des sujets, la méthode Sanger a détecté deux mutations; pour deux sujets, la méthode Sanger a détecté une mutation.

## Étude 3

L'étude portait sur les bibliothèques d'ADN préparées avec des échantillons FFPE provenant de différents types de tissus. Il y avait au total 109 échantillons FFPE provenant de huit types de tissus différents (côlon, ovaires, pancréas, glande surrénale, vessie, foie, glande thyroïde et seins) et au moins 11 échantillons FFPE de chaque type de tissu. Les tissus de la glande surrénale comportaient des métastases associées à des cancers de l'œsophage, des poumons et du côlon; les autres tissus comportaient des tumeurs primaires. Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour étudier 26 gènes couvrant 21 577 bases sur 17 chromosomes différents. Au total, six gènes différents (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR*, et *BRAF*) ont été séquencés, selon la méthode Sanger. Pour chaque tumeur, de un à trois gènes ont été séquencés selon la méthode Sanger en fonction de la prévalence attendue des mutations somatiques pour la tumeur en question. Le séquençage Sanger a identifié 39 mutations somatiques de SNV dans 33 des 109 échantillons FFPE. L'instrument MiSeqDx a identifié 36 mutations somatiques de SNV dans 32 des 109 échantillons FFPE. Il y a eu un faux négatif et deux variants pour lesquels il n'y a pas eu d'appel. La CPP était de 97,3 %. L'instrument MiSeqDx a identifié 78 975 bases de référence dans les 109 échantillons FFPE. Il y a eu 29 faux positifs par rapport aux résultats de la méthode de séquençage Sanger et 2 437 absences d'appel. La CNP était de 99,9%. Une délétion de deux bases concordait entre les deux méthodes. Le tableau 16 résume les résultats par type de tissu.

Tableau 16 Concordance positive et négative en pour cent, par type de tissus

Type de tissus	Nombre d'échantillons	Nombre total de variants	Nombre total de variants TP	Nombre total de variants FN	Nombre total d'appels TN	Nombre total d'appels FP	Nombre total d'absences d'appel	CPP	CNP
Glande surrénale	16	6	4	1	11 823	2	607	80	> 99,9
Vessie	12	4	4	0	7 070	3	273	100	> 99,9
Sein	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Côlon	11	6	5	0	8 720	2	133	100	> 99,9
Foie	13	3	3	0	7 984	1	59	100	> 99,9
Ovaire	13	7	7	0	10 581	1	724	100	> 99,99
Pancréas	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Glande thyroïde	11	3	3	0	7 429	1	652	100	> 99,9
Total	109	39	36	1	78 974	29	3 416	97,3	> 99,9

### Reproductibilité

Deux études ont été menées pour évaluer la reproductibilité de l'analyse sur l'instrument MiSeqDx d'ADN extrait d'échantillons FFPE. L'étude 1 a été menée sur plusieurs instruments et l'étude 2, sur plusieurs sites.

#### Étude 1

La reproductibilité des résultats obtenus avec l'instrument MiSeqDx a été déterminée au moyen de deux instruments, par deux opérateurs dûment formés, dans le cadre de huit analyses au total. Le test représentatif, le contexte génomique des amplicons, les échantillons et la méthode de référence sont les mêmes que ceux décrits pour l'étude de précision ci-dessus. Les résultats sont présentés par amplicon et par instrument (tableau 17) pour illustrer la reproductibilité des appels d'un instrument à l'autre. Le pourcentage d'appels exacts comprend les appels inexacts et les absences d'appel (l'appel de variants ne passe pas un ou plusieurs filtres). Les instruments ont généré des résultats semblables pour ce qui est des absences d'appel, selon les amplicons. Un seul appel inexact dans une région de fiabilité, définie par la norme de référence Platinum Genomes, a été observé par l'appareil MiSeqDx 1. L'appel inexact était un faux positif pour un variant d'insertion à l'amplicon 64, où le chromosome 10 était analysé aux positions 55892599 à 55892687; l'amplicon comportait une répétition de dinucléotides de 11.

Tableau 17 Résultats de l'étude de reproductibilité d'un instrument à l'autre pour l'instrument MiSeqDx (au niveau de l'amplicon)

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	M70215			M70217		
						Nombre total d'appels exacts	Nombre total d'appels inexacts	Nombre total d'absences d'appel	Nombre total d'appels exacts	Nombre total d'appels inexacts	Nombre total d'absences d'appel
1	1	93	93	Indel	0,22	5 580	0	0	5 580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4 740	0	0	4 740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5 448	0	12	5 453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5 518	0	2	5 518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4 858	0	2	4 860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4 200	0	0	4 200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	5 279	0	1	5 279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5 400	0	0	5 400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4 800	0	0	4 800	0	0
10	2	85	81	s. o.	0,65	4 859	0	1	4 859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4 468	0	40	4 468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5 280	0	0	5 280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5 211	0	43	5 214	0	40

14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5 453	0	7	5 449	0	11
15	2	93	93	s. o.	0,43	5 579	0	1	5 579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4 378	0	2	4 379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5 396	0	184	5 396	0	184
18	3	83	83	s. o.	0,43	4 980	0	0	4 980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4 193	0	7	4 194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	5 220	0	120	5 220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4 432	0	8	4 432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4 676	0	4	4 676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5 820	0	0	5 820	0	0
24	4	78	78	s. o.	0,29	4 679	0	1	4 677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3 720	0	0	3 720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4 140	0	0	4 140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3 676	0	45	3 671	0	51
28	5	78	75	s. o.	0,78	3 368	0	1 132	3 485	0	1 015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5 040	0	0	5 040	0	0

30	5	64	64	s. o.	0,39	3 840	0	0	3 840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4 979	0	1	4 980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4 020	0	0	4 020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5 460	0	0	5 460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4 498	0	6	4 500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6 120	0	0	6 120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5 520	0	0	5 520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5 532	0	108	5 532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5 820	0	60	5 820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5 697	0	3	5 698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5 159	0	1	5 160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5 638	0	2	5 638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5 460	0	0	5 460	0	0
43	7	73	73	s. o.	0,44	4 380	0	0	4 380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5 279	0	1	5 276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5 184	0	36	5 181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5 100	0	0	5 100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5 398	0	2	5 399	0	1

48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5 460	0	0	5 459	0	1
49	7	81	66	s. o.	0,31	3 960	0	0	3 960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5 580	0	0	5 579	0	1
51	8	83	83	s. o.	0,42	4 980	0	0	4 980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	5 219	0	121	5 220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4 020	0	0	4 020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5 879	0	1	5 880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3 894	0	6	3 895	0	5
56	9	96	96	s. o.	0,49	5 760	0	0	5 760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4 973	0	7	4 978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5 817	0	3	5 818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4 679	0	1	4 680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5 010	632	0	4 828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4 740	0	0	4 740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5 400	0	0	5 400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5 699	0	1	5 699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5 157	0	276	5 153	2	273
65	10	80	80	s. o.	0,49	4 800	0	0	4 800	0	0
66	10	81	81	s. o.	0,51	4 860	0	0	4 860	0	0

67	11	97	96	s. o.	0,45	5 760	0	0	5 760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4 199	0	2	4 200	0	1
69	11	100	100	s. o.	0,65	5 999	0	1	5 998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3 720	0	0	3 720	0	0
71	11	102	102	s. o.	0,59	6 120	0	0	6 118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4 380	0	0	4 380	0	0
73	11	85	85	s. o.	0,42	5 100	0	0	5 100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5 437	0	23	5 441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5 100	0	0	5 100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	5 100	0	0	5 100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5 100	0	0	5 100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5 040	0	60	5 038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5 577	0	3	5 573	0	7
80	12	81	81		0,49	4 860	0	0	4 860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4 260	0	0	4 260	0	0
82	12	95	95	PolyG (5)	0,68	5 605	0	95	5 605	0	95
83	13	73	73	s. o.	0,52	4 380	0	0	4 379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5 220	0	60	5 220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5 340	0	0	5 340	0	0



86	13	77	77	Indel	0,39	4 620	0	0	4 620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4 020	0	0	4 020	0	0
88	14	83	83	s. o.	0,25	4 980	0	0	4 980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4 173	0	147	4 173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4 860	0	2	4 860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5 459	0	1	5 460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3 900	0	240	3 900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5 637	0	3	5 637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5 760	0	0	5 760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4 079	0	1	4 078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5 475	0	105	5 487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5 699	0	1	5 700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4 260	0	0	4 260	0	0
99	15	91	91	s. o.	0,36	5 460	0	0	5 460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4 200	0	0	4 200	0	0
101	16	63	63	s. o.	0,27	3 780	0	0	3 780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5 700	0	0	5 700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5 220	0	0	5 220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6 238	0	3	6 238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5 443	0	17	5 444	0	16

106	17	89	89	GC(3)	0,64	5 251	0	89	5 339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5 212	0	8	5 212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5 459	0	1	5 459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5 580	0	0	5 580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5 340	0	0	5 340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4 860	0	308	4 860	0	307
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5 459	0	1	5 459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	5 460	0	60	5 460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4 699	0	41	4 700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5 153	0	7	5 156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5 039	0	1	5 039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4 020	0	0	4 020	0	0
118	18	91	91	s. o.	0,37	5 460	0	0	5 460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4 132	0	8	4 131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4 475	0	85	4 480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4 860	0	0	4 860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5 098	0	2	5 098	0	2
123	18	65	65	s. o.	0,48	3 900	0	0	3 900	0	0
124	19	99	99	s. o.	0,59	5 926	0	14	5 924	0	16

125	19	74	74	s. o.	0,68	4 440	0	0	4 438	0	2
126	19	70	70	s. o.	0,64	4 199	0	1	4 200	0	0
127	20	94	94	s. o.	0,61	5 640	0	1	5 638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4 920	0	0	4 920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4 559	0	1	4 558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	4 200	0	0	4 200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6 060	0	0	6 060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4 020	0	31	4 020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5 277	0	3	5 274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5 218	0	2	5 218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3 959	0	1	3 957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5 880	0	0	5 880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5 220	0	0	5 220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4 119	0	31	4 113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5 399	0	1	5 399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5 998	0	7	5 997	0	5
141	22	97	97	s. o.	0,68	5 819	0	1	5 819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5 818	0	2	5 816	0	4
143	22	99	99	s. o.	0,6	5 940	0	0	5 940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5 519	0	1	5 519	0	1

145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4 139	0	1	4 140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4 136	0	4	4 137	0	3
147	X	71	71	s. o.	0,52	4 260	0	0	4 260	0	0
148	Y	65	0	s. o.	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	s. o.	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Les résultats de l'étude de reproductibilité ont été analysés par opérateur, en fonction de la fréquence des variants (tableau 18). L'analyse a démontré que la fréquence des variants concorde entre les deux opérateurs. La fréquence moyenne des variants +/- un écart-type de 1 a été observée.

**Tableau 18** Comparaison des résultats de l'instrument MiSeqDx, par opérateur

Plage de fréquence des variants	Nbre de variants uniques	Nbre total de variants analysés, opérateur 1	Nbre total de variants analysés, opérateur 2	Fréquence moyenne des variants (écart-type), opérateur 1	Fréquence moyenne des variants (écart-type), opérateur 2
Fréquence élevée (~100 %)	1 112	1 072	1 072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Fréquence moyenne (~50 %)	3 240	3 151	3 161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Fréquence faible (de 3 à 7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Les résultats des huit analyses de l'étude de reproductibilité ont été regroupés par échantillon (tableau 19). La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions). Les positions de référence sont exclues. L'analyse a montré que les résultats des variants étaient reproductibles pour tous les échantillons.

**Tableau 19** Concordance des résultats des définitions des bases sur l'instrument MiSeqDx, par échantillon

Échantillon	SNV				Insertions				Délétions			
	Nbre total	Total des TP	Total des FP	Total des FN	Nbre total	Total des TP	Total des FP	Total des FN	Nbre total	Total des TP	Total des FP	Total des FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1 456	1 432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1 200	1 192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1 104	1 104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 <sup>1</sup>	3 640	3 582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup> Variants dont la fréquence est supérieure à 20 %.

<sup>2</sup> Variants dont la fréquence est inférieure à 20 %.

Les données des huit analyses de cette étude de reproductibilité confirment que l'instrument MiSeqDx peut séquencer ce qui suit de façon uniforme :

- Teneur en GC  $\geq$  19 % (toutes les bases définies dans 120 des 120 amplicons séquencés ayant une teneur en GC de 19 % ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 3,4 %)
- Teneur en GC  $\leq$  73 % (toutes les bases définies dans 120 des 120 amplicons séquencés ayant une teneur en GC de 73 % ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,1 %)
- Longueurs de PolyA  $\leq$  8 (la répétition PolyA de huit nucléotides a été appelée correctement dans 120 des 120 amplicons séquencés contenant PolyA = 8)
- Longueurs de PolyT  $\leq$  10 (la répétition PolyT de dix nucléotides a été appelée correctement dans 120 des 120 amplicons séquencés contenant PolyT = 10)
- Longueurs de PolyG  $\leq$  6 (la répétition PolyG de six nucléotides a été appelée correctement dans 720 des 720 amplicons séquencés contenant PolyG = 6)
- Longueurs de PolyC  $\leq$  6 (la répétition PolyC de six nucléotides a été appelée correctement dans 359 des 360 amplicons séquencés contenant PolyC = 6 et il y a eu une absence d'appel)
- Longueurs de répétition de dinucléotides  $\leq$  4x x (toutes les bases définies dans 600 des 600 amplicons séquencés avec une répétition de dinucléotides de 4 x ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,4 %)

- Longueurs de répétition de trinuécléotides  $\leq 5 \times$  (toutes les bases définies dans 120 des 120 amplicons séquencés avec une répétition de trinuécléotides de  $5 \times$  ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 1,9 %)
- Insertions de 24 bases ou moins et délétions de 25 bases ou moins
  - Les insertions de 24 bases ou moins ont été appelées correctement dans 120 des 120 échantillons
  - Les délétions de 25 bases ou moins ont été appelées correctement dans 182 échantillons et ont fait l'objet d'une absence d'appel dans deux des 184 échantillons

## Étude 2

Une étude externe a été réalisée pour évaluer la reproductibilité du test représentatif à deux gènes, décrit à l'étude de précision 2, dans trois sites de tests externes (deux opérateurs par site), avec un lot de réactifs, sur trois jours non consécutifs. Les tests ont été faits sur six panels d'échantillons bien caractérisés d'ADN génomique provenant d'échantillons cliniques FFPE ou de lignées cellulaires. Chaque panel comportait 10 éléments, pour un total de 60.

Les 60 éléments des panels étaient formés de doublons de quatre échantillons uniques de type sauvage (pour les mutations du panel), de 12 échantillons mutants uniques (avec une seule mutation) préparés à des niveaux de fréquence de mutation faibles et élevés, et de deux échantillons mutants uniques (avec une seule mutation) préparés uniquement à un faible niveau de fréquence de mutation. Pour chaque échantillon unique/niveau de fréquence de mutation (testé en double dans chaque analyse), il y avait 36 résultats possibles (deux répliquats  $\times$  deux opérateurs  $\times$  trois jours  $\times$  trois sites) si tous les résultats étaient valides.

Le taux d'appels attendus en pour cent pour tous les variants positifs et négatifs a été évalué en comparant les résultats du test représentatif aux résultats attendus des mutations (mutations attendues détectées ou non détectées) dans chaque échantillon. Le taux d'appels attendus en pour cent est calculé en multipliant 100 % par le nombre d'appels attendus, divisé par le nombre d'appels tentés. L'intervalle de confiance bilatéral de 95 % est calculé selon la méthode de Wilson.

Pour l'ensemble des sites, le débit était  $\geq 94,7$  % au premier passage de l'échantillon ou pour les échantillons des analyses qui étaient valides au premier passage. Pour l'ensemble des échantillons mutants, le taux d'appels attendus en pour cent au niveau de la mutation était de 99,6 % (905/909) (IC de 95 %; 98,9, 99,8).

Le nombre de tentatives d'appel pour les 56 mutations du panel (que la mutation détectée ait été attendue ou non) pour tous les échantillons valides était de 58 856 (56  $\times$  1 051). De ces 58 856 observations au niveau de la mutation, les résultats attendus et observés n'étaient discordants que dans six cas; le taux d'appels attendus en pour cent au niveau de la mutation, pour tous les variants positifs et négatifs de tous les éléments mutants ou de type sauvage du panel combinés, était de 99,99 % (58 850/58 856).

## Sensibilité analytique (limite de blanc (LB) et limite de détection (LD))

Cette étude servait à évaluer la limite du test et à déterminer la limite de détection (LD) de l'instrument MiSeqDx avec un panel représentatif. En bref, les lignées cellulaires GM12878 et GM12877, bien caractérisées par le Platinum Genome, ont été fixées au formol et imprégnées à la paraffine, puis l'ADN a été extrait. GM12878 a été dilué avec GM12877 de façon à ce que la fréquence de 70 variants (52 SNV, neuf insertions et neuf délétions) soit près de 0,05. Les deux échantillons d'ADN ont été testés par deux opérateurs, sur deux instruments, avec deux lots de réactifs, ce qui a donné un total de dix analyses de séquençage MiSeqDx. Il en a résulté 40 réplicats pour chaque variant de GM12878 et 60 réplicats pour chaque coordonnée correspondante de type sauvage de GM12877, pour chaque lot de réactifs. La LB et la LD ont été calculées au moyen des méthodes habituelles énoncées dans la norme CLSI EP17-A2 en utilisant l'option non paramétrique. La LB et la LD ont été calculées séparément pour les SNV, les insertions et les délétions en regroupant les fréquences de variants pour chaque type de variant. L'erreur de type I a été définie à 0,01 et l'erreur de type II, à 0,05.

Pour la LB, les fréquences de variants regroupées ont été classées de la moins élevée à la plus élevée, et la position arrivant au 99<sup>e</sup> rang a été calculée pour chaque lot de réactifs, pour chaque type de variant (tableau 20). Le logiciel de l'instrument MiSeqDx utilise comme limite (la LB appliquée) la fréquence de variants de 0,026 pour déterminer la détection qualitative des variants. La limite de blanc calculée servait à vérifier que cette limite n'entraîne que des erreurs de type I ne dépassant pas 0,01.

Tableau 20 Limite de blanc

Type de variant	Nombre total de fréquences de variants	LB, Lot de réactifs 1 (en %)	LB, Lot de réactifs 2 (en %)
SNV	3 120	0,87	0,75
Insertion	540	0,79	0,60
Délétion	540	0,96	0,84

Pour la LB, le pourcentage de la fréquence de chaque mutation pour chaque lot de réactifs et pour chaque type de variant tombant sous la limite de 0,026 a été calculé (tableau 21). Puisque les pourcentages étaient inférieurs à ceux des erreurs de type II, soit 5 % (0,05), la médiane des fréquences de variants combinées a été établie comme LD (tableau 22). La LD de chaque type de variant a été utilisée comme la plus élevée des deux valeurs calculées pour les deux lots de réactifs (5,45 % pour les SNV, 4,88 % pour les insertions et 5,44 % pour les délétions).

Tableau 21 Limite de détection

Lot de réactifs	Type de variant	Nombre total de fréquences de variants (VF)	Nbre de mesures de VF < 2,6 %	% de mesures de VF < 2,6 %	Limite de détection (%)
1	SNV	2 080	5	0,20	5,45
	Insertion	360	0	0,00	4,86
	Délétion	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2 080	26	1,30	5,44
	Insertion	360	0	0,00	4,88
	Délétion	360	0	0,00	5,24

Les études suivantes montrent les caractéristiques de performance de l'instrument MiSeqDx avec un autre test représentatif ciblant 56 mutations dans deux gènes du cancer pertinents sur le plan clinique (panel de mutation). Le panel de mutation est conçu pour détecter expressément 56 mutations dans deux gènes du cancer pertinents sur le plan clinique (gène 1 et gène 2).



Le test détermine simultanément la présence ou l'absence de chacune des 56 mutations dans chaque échantillon séquencé. La méthode de référence de ces études est la méthode de séquençage bidirectionnel Sanger.

### Précision entre lots

Une étude examinant la précision entre lots a été menée pour évaluer la performance de l'instrument MiSeqDx pour l'ensemble des lots de trousse de réactifs manufacturés (y compris la validation des échantillons, la préparation des bibliothèques et les réactifs de séquençage) au moyen du test représentatif de deux gènes et d'un panel de cinq échantillons FFPE mélangés répondant aux exigences de validation des échantillons. Chaque échantillon FFPE comportait deux mutations uniques : l'une à un niveau de fréquence de mutation peu élevé (environ 8 %) et l'autre à un niveau de fréquence de mutation élevé (environ 14 %). Douze (12) observations ont été obtenues pour chacun des cinq mélanges d'échantillons, sur trois jours non consécutifs, au moyen de trois lots de trousse de réactifs. Le nombre total d'observations de l'étude, pour l'ensemble des lots de réactifs, était de 180 observations pour l'ensemble des mélanges d'échantillons et de 360 observations pour l'ensemble des niveaux de fréquence des mutations. Pour l'ensemble des lots et des jours, 99,7 % des observations (359/360) ont donné les résultats de mutation attendus. Une mutation à fréquence faible a été caractérisée de type sauvage de façon erronée. Une analyse des composantes de variance a été menée pour chaque mutation/niveau de fréquence des mutations, pour estimer la variabilité du système. L'écart-type total varie de 0,011 à 0,029. La composante de l'écart-type total correspondant au lot de réactifs varie de 0 à 0,015.

## Brevets et marques de commerce

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et à ses sociétés affiliées (« Illumina »); ils sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et ne seront communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

**LE MANQUEMENT À LIRE COMPLÈTEMENT ET À SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES POURRA CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES AUX PERSONNES, UTILISATEURS OU AUTRES, ET DES DOMMAGES AUX AUTRES BIENS.**

**ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).**

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Illumina, MiSeqDx, TruSeq, la couleur citrouille et la conception de bases en flux sont des marques de commerce d'Illumina, Inc. ou de ses sociétés affiliées aux États-Unis ou dans d'autres pays. Tous les autres noms, logos et marques de commerce sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

## Coordonnées



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, CA 92122 États-Unis  
+(1) 800 809-ILMN (4566)  
+(1) 858 202-4566 (en dehors de l'Amérique  
du Nord)  
techsupport@illumina.com  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B. V.  
Freddy van Riemsdijkweg  
15  
5657 EE Eindhoven  
Pays-Bas

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

## Étiquette du produit

Pour voir la liste complète des symboles qui figurent sur l’emballage et l’étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles, sur le site [support.illumina.com](http://support.illumina.com), à l’onglet *Documentation & Literature* (Documentation) propre à votre trousse.