

Instrument MiSeq™Dx

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT

Utilisation prévue

L'instrument MiSeqDx est à utiliser pour le séquençage ciblé de bibliothèques d'ADN issues d'ADN génomique humain extrait du sang périphérique ou des tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFIP), lorsque les analyses effectuées à l'aide de l'instrument sont destinées au diagnostic *in vitro*. L'instrument MiSeqDx n'est pas destiné au séquençage du génome entier ou *de novo*. L'instrument MiSeqDx doit être utilisé avec des réactifs DIV enregistrés, homologués, purifiés ou approuvés et un logiciel analytique.

Principes de procédures

L'instrument MiSeqDx d'Illumina est à utiliser pour le reséquençage ciblé de l'ADN humain à l'aide des consommables et bibliothèques d'Illumina préparés à partir d'ADN génomique humain extrait du sang périphérique ou de tissus FFIP en utilisant des réactifs DIV enregistrés, homologués, purifiés ou approuvés. Les bibliothèques sont préparées en amplifiant les cibles et en ajoutant des index d'échantillons et des séquences de capture. Les bibliothèques d'échantillons sont emprisonnées sur une cellule de débit et séquencées avec l'instrument en utilisant la chimie de séquençage par synthèse (SBS). La chimie SBS utilise une méthode de terminaison réversible afin de détecter des bases de nucléotides uniques alors qu'elles sont incorporées aux brins d'ADN en croissance. Le logiciel Real-Time Analysis (RTA) effectue des analyses d'images et des définitions de bases et affecte un score de qualité à chaque base pour chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, l'analyse secondaire sur l'instrument MiSeqDx traite les définitions de bases.

Le traitement comprend généralement le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, la définition de variants et la génération de fichiers au format de définitions de variants (VCF) qui contiennent toutes les informations sur les variants trouvés dans des positions spécifiques dans un génome de référence. L'instrument MiSeqDx utilise différents modules pour effectuer l'analyse secondaire en fonction du flux de travail.

Configuration à double amorçage

La configuration à double amorçage comprend des procédures matérielles, logicielles et d'installation pour permettre à l'instrument MiSeqDx d'exécuter des séquençages de diagnostic *in vitro* (DIV) et de recherche uniquement (Research use only, RUO). La configuration à double amorçage permet à

l'utilisateur de passer du mode diagnostic au mode recherche de l'instrument. Les identifications par radiofréquence (RFID) sur les consommables nécessaires au séquençage permettent d'éviter l'utilisation de réactifs de séquençage RUO lors de séquençages de diagnostic.

Limites de la procédure

- Destiné au diagnostic *in vitro* uniquement.
- Les résultats présentés sur l'étiquette ont été obtenus grâce à des panels représentatifs analysés à l'aide du sang périphérique ou des lignes cellulaires pour les performances germinales et les tissus FFIP ou des lignes cellulaires FFIP pour les performances somatiques en utilisant les réactifs et modules du logiciel décrits. Les modules Germline Variant (Variant germinal) et Somatic Variant (Variant somatique) ont été développés afin d'évaluer les performances avec des analyses représentatives. Les caractéristiques de performances sont fournies à titre informatif uniquement. Les tests de validation présentés servent uniquement à illustrer les capacités globales de l'instrument et ne définissent pas les capacités de l'instrument ou son adéquation par rapport à toute revendication spécifique. Tous les tests de diagnostic développés pour cet instrument nécessitent une validation complète de tous les aspects de performances.
- Ce produit peut uniquement fournir ce qui suit :
 - Sortie de séquençage de ≥ 5 Gb à une longueur de lecture de 2 x 150 pb
 - ≥ 15 millions de lectures passant le filtre à une longueur de lecture de 2 x 150 pb
 - Bases supérieures à Q30 ≥ 80 % à une longueur de lecture de 2 x 150 pb
80 % ou plus des bases ont un score de qualité Phred supérieur à 30, indiquant que la précision des définitions de bases est supérieure à 99,9 %.
- L'instrument MiSeqDx a été uniquement validé pour séquencer des bibliothèques d'ADN humain extrait du sang périphérique ou de tissus FFIP. Les bibliothèques générées à partir d'autres types de spécimens ne doivent pas être utilisées avec cet instrument pour le diagnostic *in vitro*. Les performances de cet instrument pour le séquençage d'acides nucléiques microbiens ou viraux n'ont pas été définies.
- L'instrument MiSeqDx est à utiliser pour le diagnostic *in vitro* avec des réactifs ou analyses DIV enregistrés et homologués, purifiés ou approuvés. Les limites relatives aux réactifs et les caractéristiques de performances décrites dans cette notice informative sont basées sur les analyses représentatives et les modules du logiciel. Pour les analyses DIV, consultez la notice spécifique à l'analyse pour en savoir plus sur l'utilisation prévue, les mutations détectées et les types d'échantillons.
- Les indels (insertions, délétions et combinaisons des deux) d'une longueur supérieure à 25 pb ne sont pas incluses dans le logiciel analytique. Par conséquent, le logiciel analytique ne détecte pas les indels d'une longueur supérieure à 25 pb.

- Le système a été validé pour détecter les variants mononucléotidiques (SNV, single nucleotide variant) et les délétions d'une taille allant jusqu'à 25 pb et les insertions d'une taille allant jusqu'à 24 pb lorsqu'il est utilisé avec les modules Germline Variant (Variant germlinal) et Somatic Variant (Variant somatique). Pour la définition de mutations somatiques, les délétions de 25 pb et les insertions de 18 pb ont été détectées à une fréquence de variant de 0,05.
- Les lectures d'amplicons avec une mutation extrême ne sont peut-être pas prises en compte par le logiciel analytique. C'est la raison pour laquelle la section « sauvages » a été créée. Un tel contenu extrême comprend :
 - Les lectures contenant plus de trois indels.
 - Les lectures d'une longueur d'au moins 30 pb avec un contenu SNV supérieur à 4 % de la longueur cible totale de l'amplicon (sauf les zones sondées).
 - Les lectures d'une longueur inférieure à 30 pb avec un contenu SNV supérieur à 10 % de la longueur cible totale de l'amplicon (y compris les zones sondées).
- Les grands variants, y compris les mutations multinucléotidiques (MNV, multi-nucleotide variant) et les grandes indels, peuvent être signalés comme des variants distincts et plus petits dans le fichier VCF de sortie.
- Les délétions peuvent être filtrées ou manquantes lorsque deux amplicons tuilés se chevauchent si la longueur de la délétion est égale ou supérieure au chevauchement entre les deux amplicons tuilés.
- Le système est incapable de détecter les indels si celles-ci sont directement adjacentes à un primer et si aucun amplicon ne se chevauche. Pour les zones où les amplicons se chevauchent, l'analyse ne peut pas détecter les délétions lorsque la zone de chevauchement est plus petite que la taille de la délétion à détecter. Par exemple, si la zone de chevauchement entre les deux amplicons est deux (2) bases, l'analyse ne peut pas détecter les délétions, y compris ces deux bases. Une délétion à base unique, sur l'une de ces bases peut être détectée.
- Comme pour toute préparation de bibliothèque par hybridation, les polymorphismes, les mutations, les insertions ou les délétions sous-jacents dans les zones de liaison aux oligonucléotides peuvent affecter les allèles sondés. Par conséquent, les appels passés lors du séquençage sont également affectés. Par exemple :
 - Un variant en phase avec un variant dans la zone de primer peut ne pas être amplifiée et peut résulter en un faux négatif.
 - Les variants dans la zone de primer peuvent empêcher l'amplification de l'allèle de référence et cela peut causer une définition de variant homozygote incorrecte.
 - Les variants de type indel dans la zone de primer peuvent causer une définition fautive positive à la fin de la lecture adjacente au primer.
- Les indels peuvent être filtrés en raison d'une distorsion du brin si cela arrive à proximité de la fin d'une lecture et sont ignorées lors de l'alignement.
- Les petites MNV n'ont pas été validées.

- Les variants du nombre de copies ou les variants structurels, comme les fusions ou les translocations, n'ont pas été validés.
- Limites relatives aux variants germinaux :
 - Le système MiSeqDx, plus spécifiquement le module Germline Variant (Variant germlinal), est conçu pour fournir des résultats qualitatifs pour la définition de variants germinaux (c.-à-d., homozygote, hétérozygote, sauvage).
 - Lorsque le module Germline Variant (Variant germlinal) est utilisé, la couverture minimale par amplicon nécessaire pour une définition de variants précis est 150x. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées affectent la couverture. Le contenu GC et d'autres taux génomiques peuvent affecter la couverture.
 - La variation du nombre de copies peut affecter l'identification d'un variant comme homozygote ou hétérozygote.
 - Les variants dans un certain contexte répétitif ne sont pas inclus dans les fichiers VCF. Le filtre de répétition RMxN est utilisé pour filtrer les variants si toute, ou une partie de, la séquence du variant est présente de façon répétée dans le génome de référence adjacent à la position du variant. Pour la définition de variants germinaux, au moins 9 répétitions dans la référence sont nécessaires pour qu'un variant soit filtré, et seules les répétitions avec une longueur maximale de 5 pb sont prises en compte (R5x9).
- Limites relatives aux variants somatiques :
 - Le système MiSeqDx, plus spécifiquement le module Somatic Variant (Variant somatique), est conçu pour fournir des résultats qualitatifs pour la définition de variants somatiques (c.-à-d., présence d'un variant somatique avec une fréquence de variant supérieure ou égale à 0,026 avec une limite de détection de 0,05).
 - Lorsque le module Somatic Variant (Variant somatique) est utilisé, la couverture minimale par amplicon nécessaire pour une définition de variants précis est 450x par groupe d'oligonucléotides. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées affectent la couverture. Le contenu GC et d'autres taux génomiques peuvent affecter la couverture.
 - Les variants dans un certain contexte répétitif ne sont pas inclus dans les fichiers VCF. Le filtre de répétition RMxN est utilisé pour filtrer les variants si toute, ou une partie de, la séquence du variant est présente de façon répétée dans le génome de référence adjacent à la position du variant. Pour la définition de variants somatiques, au moins 6 répétitions dans la référence sont nécessaires pour que le variant soit filtré, et seules les répétitions avec une longueur maximale de 3 pb sont prises en compte (R3x6).
 - Le module Somatic Variant (Variant somatique) est incapable de différencier les variants germinaux et somatiques. Le module est conçu pour détecter les variants à travers une plage de fréquences de variant, mais la fréquence de variant ne peut pas être utilisée pour différencier les variants somatiques et les variants germinaux.

- Les tissus normaux dans le spécimen affectent la détection des variants. La limite de détection signalée est basée sur la fréquence de variant par rapport à l'ADN total extrait du tissu tumoral et normal.

Composants du produit

Les composants de l'instrument MiSeqDx d'Illumina sont les suivants :

Instrument MiSeqDx (numéro de référence DX-410-1001)

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

Application logicielle	Fonction	Description
MiSeq Operating Software (MOS)	Contrôle le fonctionnement de l'instrument	L'application logicielle MOS prend en charge le fonctionnement de l'instrument lors du séquençage et génère des images à utiliser avec le logiciel Real-Time Analysis (RTA). Pour de plus amples renseignements, consultez le <i>Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v4 (document n° 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Réalise des analyses primaires	L'application logicielle RTA convertit les images générées par MOS pour chaque tuile par cycle de l'exécution de séquençage en fichiers d'appels de bases, qui sont des entrées pour les modules d'analyse Local Run Manager. L'application logicielle RTA n'est pas dotée d'une interface utilisateur.
Local Run Manager	Interface pour la sélection du module	Le logiciel Local Run Manager est une solution intégrée à l'instrument pour la gestion des utilisateurs, l'exécution d'analyses secondaires et la vérification de l'état. Pour de plus amples renseignements, consultez le <i>Guide de référence du logiciel Local Run Manager v3 pour MiSeqDx (document n° 200003931)</i> .

Stockage et manutention

Élément	Spécification
Température	Transport et stockage : -10 °C à 40 °C Conditions de fonctionnement : 19 °C à 25 °C
Humidité	Transport et stockage : humidité sans condensation Conditions de fonctionnement : 30 à 75 % d'humidité relative (sans condensation)

Équipement et matériaux nécessaires, non fournis

Consommables nécessaires au séquençage

MiSeqDx Reagent Kit v3 (numéro de référence 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (numéro de référence 20063860)

Consommables fournis par l'utilisateur

Assurez-vous que les consommables fournis par l'utilisateur suivants sont à portée de main avant de lancer le séquençage.

Consommable	Utilisation
Lingettes imbibées d'alcool, alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	Nettoyer le verre et le plateau de la cellule de débit
Serviette de laboratoire, non-pelucheuse	Nettoyer le plateau de la cellule de débit
Chiffon pour objectif, 4 x 6 po.	Nettoyer la cellule de débit
Tween 20	Nettoyer l'instrument
Pince à épiler carrée en plastique (facultatif)	Retirer la cellule de débit du contenant d'expédition des cellules de débit
Eau destinée à un usage en laboratoire	Nettoyer l'instrument

Directives relatives à l'eau destinée à un usage en laboratoire

Toujours utiliser de l'eau destinée à un usage en laboratoire ou de l'eau désionisée pour effectuer les procédures relatives à l'instrument. Ne jamais utiliser l'eau du robinet.

Utiliser uniquement les catégories d'eau suivantes ou leurs équivalents :

- Eau désionisée
- Illumina PW1
- Eau 18 mégohms (M Ω)
- Eau Milli-Q
- Eau Super-Q
- Eau destinée à un usage en biologie moléculaire

Avertissements et Précautions



AVERTISSEMENT

Cet ensemble de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire adaptés au risque d'exposition. Manipuler les réactifs usagés comme des déchets chimiques et les mettre au rebut conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, reportez-vous à la fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

- Manipuler tous les spécimens de sang comme s'ils étaient contaminés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite B (VHB) ou tout autre agent pathogène hématogène (précautions universelles).
- Le défaut de suivre les procédures, telles que spécifiées, peut causer des résultats erronés ou une diminution significative de la qualité de l'échantillon.
- Prendre les précautions de routine en laboratoire. Ne pas injecter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail. Porter des gants à usage unique et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des spécimens et des réactifs du kit. Se laver correctement les mains après avoir manipulé les spécimens et les réactifs du kit.
- Des pratiques de laboratoire adéquates et une bonne hygiène de laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, l'instrument et les échantillons d'ADN génomiques. La contamination par PCR peut causer des résultats inexacts et peu fiables.

- Pour empêcher la contamination, s'assurer que les zones de pré- et post-amplification sont équipées de l'équipement et des consommables nécessaires (p. ex., les pipettes, les blocs chauffant, les vortex et les centrifugeuses).
- Lorsque cela est approprié, le jumelage index-échantillon doit correspondre exactement à la disposition du plateau imprimé. Local Run Manager remplit automatiquement les primers d'indexation associés aux noms d'échantillons, lorsqu'ils sont saisis dans le module. Il est recommandé de vérifier les primers d'indexation associés aux échantillons avant de commencer le séquençage. Le mauvais placement de l'échantillon par rapport à la disposition du plateau cause une diminution d'identification des échantillons positifs et un signalement incorrect des résultats.
- L'installation d'un logiciel antivirus fourni par l'utilisateur est fortement recommandée pour protéger l'ordinateur des virus. Consulter le manuel de l'utilisateur pour obtenir des instructions relatives à l'installation.
- Ne pas utiliser MiSeqDx si l'un des panneaux est retiré. L'utilisation de l'instrument avec l'un des panneaux retiré crée une exposition potentielle aux tensions secteur et CC.
- Ne pas toucher la cellule de débit dans le compartiment de la cellule de débit. Le chauffage de ce compartiment fonctionne à des températures comprises en 22 °C et 95 °C et peut causer des brûlures.
- L'instrument pèse environ 57 kg et peut causer de graves blessures s'il tombe et n'est pas manipulé correctement.
- Signaler immédiatement tout incident grave relatif à ce produit à Illumina et à l'Autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Mode d'emploi

Le mode d'emploi suivant de l'instrument MiSeqDx nécessite des réactifs fournis dans le kit MiSeqDx Reagent Kit v3.

Créer un séquençage avec Local Run Manager

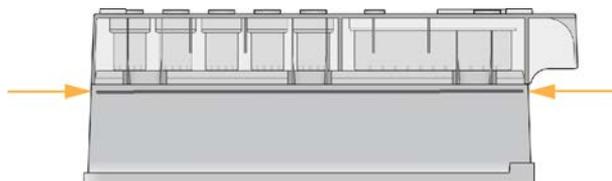
Pour obtenir des instructions détaillées sur la façon de créer un séquençage, consultez le *Guide de référence du logiciel Local Run Manager v3 pour MiSeqDx (document n° 200003931)* et le Guide du module Local Run Manager pour le module analytique que vous utilisez.

Préparer la cartouche de réactifs

Les instructions suivantes expliquent comment décongeler les réactifs à l'aide d'un bain d'eau à température ambiante.

1. Retirez la cartouche de réactifs de l'espace de stockage dont la température est comprise entre -15°C à -25°C .
2. Placez la cartouche de réactifs dans un bain d'eau contenant suffisamment d'eau désionisée à température ambiante pour immerger la base de la cartouche de réactifs jusqu'au repère imprimé sur la cartouche de réactifs. Veillez à ce que l'eau ne dépasse pas le repère maximum.

Figure 1 Repère maximum



3. Laissez la cartouche de réactifs décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ 60 à 90 minutes ou jusqu'à ce qu'elle soit totalement décongelée.
4. Retirez la cartouche du bain d'eau et tapez-la doucement contre la table 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 le dessus de la cartouche de réactifs.

Inspecter la cartouche de réactifs

1. Retournez dix fois la cartouche de réactifs pour mélanger les réactifs décongelés, puis vérifiez que toutes les positions sont décongelées.
2. Vérifiez les réactifs dans les positions 1, 2 et 4 pour vous assurer qu'ils sont totalement mélangés et exempts de sédiment.

REMARQUE Il est important que les réactifs dans la cartouche soient totalement décongelés et mélangés pour assurer un séquençage adéquat.

3. Tapez doucement la cartouche contre la table pour éliminer les bulles d'air dans les réactifs.

REMARQUE Les tubes d'aspiration MiSeqDx se placent au fond de chaque réservoir afin d'aspirer les réactifs. Il est donc important que les réservoirs soient exempts de bulles d'air.

4. Placez la cartouche de réactifs sur glace ou mettez-la de côté à une température comprise entre 2°C et 8°C (jusqu'à six heures) jusqu'à ce que le séquençage puisse être lancé. Pour de meilleurs résultats, chargez directement les échantillons et lancez le séquençage.

Préparer les échantillons pour le séquençage

Pour obtenir des directives sur la préparation des bibliothèques au séquençage, y compris la dilution et le regroupement de la bibliothèque, consultez la section Mode d'emploi de la notice sur la préparation de la bibliothèque.

La dilution des bibliothèques d'échantillons dépend de la complexité des groupes d'oligonucléotides. Il est nécessaire d'optimiser la densité de l'amplification pour travailler avec l'instrument MiSeqDx et la densité optimale de l'amplification varie en fonction du test de préparation de la bibliothèque.

Charger les bibliothèques d'échantillons dans la cartouche

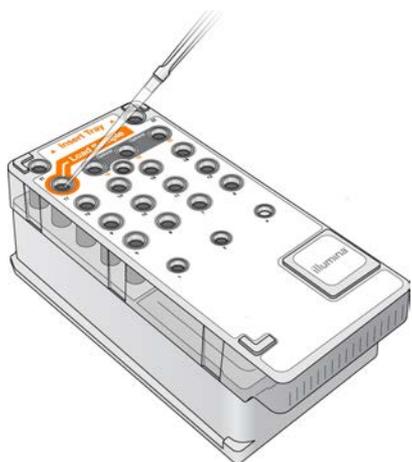
Lorsque la cartouche de réactifs est totalement décongelée et prête à l'utilisation, vous pouvez y charger les échantillons.

1. Utilisez un embout de pipette de 1 ml distinct, propre et vide pour percer l'opercule sur le réservoir de la cartouche de réactifs. Celui-ci est étiqueté **Load Samples** (Charger les échantillons).

REMARQUE Ne percez aucun autre endroit sur la cartouche de réactifs. Tout autre endroit est percé automatiquement durant le séquençage.

2. Insérez, à l'aide de la pipette, 600 µl des bibliothèques d'échantillons de la bibliothèque d'amplicons dilués préparées dans le réservoir **Load Samples** (Charger les échantillons). Évitez de toucher l'opercule.
3. Vérifiez la présence de bulles d'air dans le réservoir avant de charger l'échantillon. Si vous remarquez des bulles d'air, tapez légèrement la cartouche contre la table pour en retirer les bulles.

Figure 2 Charger les bibliothèques



4. Utilisez l'interface MiSeq Operating Software (MOS) pour configurer les étapes de séquençage.

Configuration du séquençage

Consultez le *Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v4 (document n° 200010452)* pour obtenir des instructions détaillées sur la configuration du séquençage.

1. Connectez-vous à MiSeqDx avec votre mot de passe pour Local Run Manager.
2. À partir de l'écran d'accueil du logiciel MOS, sélectionnez **Sequence** (Séquence).
3. Sélectionnez un séquençage dans la liste, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
Des écrans de configuration du séquençage s'ouvrent dans l'ordre suivant : Load Flow Cell (Charger la cellule de débit), Load Reagents (Charger les réactifs) et Pre-Run check (Vérification de pré-séquençage).
4. Lorsque l'écran Load Flow Cell (Charger la cellule de débit) apparaît, nettoyez et chargez la cellule de débit.
5. Fermez le verrou de la cellule de débit et la porte du compartiment de la cellule de débit.
Le verrou et la porte du compartiment doivent être fermés avant le début du séquençage.
Lorsque la cellule de débit est chargée, le logiciel lit et enregistre la RFID. Une confirmation de lecture réussie de la RFID apparaît dans le coin inférieur droit de l'écran.
6. Suivez les invites du logiciel à charger le flacon de solution SBS MiSeqDx (PR2), assurez-vous que le flacon usagé est vide, puis chargez la cartouche de réactifs.
Lorsque le flacon de solution SBS MiSeqDx (PR2) et la cartouche de réactifs sont chargés, le logiciel lit et enregistre la RFID. Une confirmation de lecture réussie de la RFID apparaît dans le coin inférieur droit de l'écran.
7. L'écran Sequencing (Séquençage) s'ouvre au début du séquençage. Cet écran fournit une représentation visuelle du séquençage en cours d'exécution, y compris les intensités et les scores de qualité (Q-scores).

Résultats

Real-Time Analysis (RTA) est un logiciel intégré qui effectue des analyses d'images et des définitions de bases et affecte un score de qualité à chaque base pour chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, le module de l'instrument MiSeqDx sélectionné à la page 1 de [Créer un séquençage avec Local Run Manager, page 8](#) commence l'analyse secondaire. Consultez la documentation spécifique aux analyses pour de plus amples renseignements sur d'autres flux de travail.

Procédures de contrôle de la qualité

Le logiciel MiSeqDx évalue chaque séquençage, chaque échantillon et chaque définition de bases par rapport à des métriques de contrôle de la qualité. Lorsque cela est nécessaire, les contrôles positifs et négatifs inclus dans la préparation de la librairie doivent également être évalués pour les résultats attendus.

Caractéristiques de performances

Toutes les études ont été réalisées à l'aide de l'instrument MiSeqDx.

Les études germinales ont utilisé les réactifs MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ou TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pour la préparation de la librairie. Les deux kits utilisent les mêmes réactifs de préparation de la librairie et ont une seule différence dans le flux de travail : le nombre de cycles de réaction en chaîne par polymérase (PCR) (25 et 28, respectivement). Les cycles PCR supplémentaires permettent un apport en ADN plus faible avec le kit TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) par rapport au kit MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), tel qu'illustré dans l'étude sur l'apport en ADN à l'aide du kit TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Les librairies préparées avec le kit MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ont été séquencées avec les réactifs de séquençage présents dans le kit. Les librairies préparées avec le kit TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ont été séquencées avec le kit MiSeqDx Reagent Kit v3. Ces derniers réactifs de séquençage ont augmenté la sortie par rapport à ceux utilisés dans le kit MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Les tests englobent les plages de débit d'échantillons prises en charge par le kit MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Le produit MiSeqDx peut prendre en charge 1 à 96 échantillons/cycle, selon le test. Le kit MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro est conçu pour prendre en charge des débits d'échantillons inférieurs dans cette plage pour les tests sélectionnés.

Les études somatiques ont utilisé le kit TruSeq Custom Amplicon Kit Dx en association avec le kit MiSeqDx Reagent Kit v3.

Les flux de travail germinaux ou somatiques, décrits pour la préparation de librairies avec le kit TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pour le séquençage, ont été suivis d'analyses à l'aide du module Germline Variant (Variant germlinal) ou Somatic Variant (Variant somatique), exception faite de deux cas. Les études utilisant la performance sur un gène (performance germinale ; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) ou sur deux gènes (performance somatique) comme panels de mutations représentatifs ont utilisé des flux de travail et modules analytiques spécifiques à l'analyse.

REMARQUE L'information génomique des amplicons est résumée par rapport au brin génomique séquencé. Pour les amplicons conçus contre le brin négatif, le contenu du génome de référence est le complément inversé (par exemple, les zones PolyA sur les amplicons du brin négatif correspondent aux zones PolyT du génome de référence).

Définitions des calculs utilisés dans les caractéristiques de performances

- Le pourcentage de concordance positive (PCP) est calculé comme le pourcentage de loci classés comme variants par une méthode de référence qui sont correctement signalés par l'analyse.
 - $(\text{nombre de loci avec variant signalés par l'analyse}) / (\text{nombre total de loci avec variant})$
Les loci avec variant signalés par le séquençage qui correspondent à la méthode de référence sont des vrais positifs (VP). Les loci avec variant signalés comme définitions de référence ou définitions de variants différents sont des faux négatifs (FN)
- Le pourcentage de concordance négative (PCN) est calculé comme le pourcentage de loci classés comme sauvages par une méthode de référence qui sont correctement signalés par l'analyse.
 - $(\text{nombre de loci sauvages signalés par l'analyse}) / (\text{nombre total de loci sauvages})$
Les loci sauvages signalés par l'analyse qui correspondent à la méthode de référence sont des vrais négatifs (VN). Les loci sauvages signalés comme variants par l'analyse sont des faux positifs (FP).
- Le pourcentage de concordance globale (PCG) est calculé comme le pourcentage de loci correctement signalés par l'analyse par rapport à une méthode de référence.
 - $((\text{nombre de loci avec variant signalés par l'analyse}) + (\text{nombre de loci sauvages correctement signalés par l'analyse})) / ((\text{nombre total de loci avec variant}) + (\text{nombre total de loci sauvages}))$
- Pour les applications de définitions de variants, les calculs du PCP, PCN et PCG ne comprennent pas les sans définitions (loci avec variant ou de référence ne répondant pas à un ou plusieurs filtres de qualité). Deux études comprennent spécifiquement les sans définitions dans leur métrique « % de définitions correctes » ; cette inclusion des sans définitions est notée pour les tableaux applicables.
- Le taux de définitions est calculé comme le nombre total de loci passant les filtres divisé par le nombre total de positions séquencées pour les chromosomes 1 à 22. Les chromosomes X et Y ne sont pas inclus. Cette métrique ne tient pas compte de la concordance des définitions avec la méthode de référence.

Pour les caractéristiques de performances relatifs aux facteurs pré-analytiques (p. ex., méthodes d'extraction ou apport en ADN), consultez la notice informative pour la méthode de préparation de la librairie applicable.

Indexation des échantillons

Les primers d'indexation des échantillons, ajoutés lors de la préparation de la bibliothèque, attribuent une séquence unique à chaque échantillon d'ADN, permettant à de multiples échantillons d'être regroupés dans un seul séquençage. L'indexation des échantillons a été testée pour les flux de travail germinaux et somatiques.

Un total de 96 index d'échantillons a été testé dans le cadre d'une analyse représentative conçue pour demander une variété de gènes couvrant 12 588 bases par brin pour la totalité des 23 chromosomes humains afin de vérifier la capacité de l'analyse à réaliser une définition du génotype pour un échantillon donné parmi différentes combinaisons de primers d'indexation. Le chromosome Y ne contient pas de zone sûre et n'a pas été évalué. Huit échantillons uniques ont été testés avec 12 combinaisons de primers d'indexation différentes par échantillon. Les résultats des échantillons générés par le module d'analyse germinale ont été comparés au projet Génomes Platines version 2016-01. Le PCP (SNV et indels) était supérieur à 97 % (il y avait au moins 70 définitions vraies positives pour les SNV, 38 pour les insertions et 36 pour les délétions) et le PCN était de 100 % (au moins 23 440 positions de référence par combinaison d'index) pour chacune des 96 combinaisons d'index. Un index unique a été testé indépendamment afin de vérifier que la chimie de séquençage du produit MiSeqDx Reagent Kit v3 peut prendre en charge moins de huit échantillons (la chimie du kit universel MiSeqDx 1.0 pouvait prendre en charge huit échantillons minimum). L'index unique avait des valeurs PCP de 98,9 % (180/182) pour les SNV, 100 % (38/38) pour les insertions et 100 % (46/46) pour les délétions. Le PCN était de 100 % (23 856/23 856).

Douze répliques (24 bibliothèques) d'un échantillon ont été testées pour mesurer la précision avec les variants somatiques à des fréquences comprises entre 0,05 et 0,10 à l'aide du module Somatic Variant (Variant somatique) (deux combinaisons d'index par réplique sont utilisées pour effectuer les définitions somatiques). Le PCP était de 100 % pour les SNV (64/64), les insertions (11/11) et les délétions (19/19). Le PCN était de 100 % (au moins 11 590 positions de référence par combinaison) pour toutes les combinaisons d'index.

Transfert des échantillons

Le flux de travail de l'instrument MiSeqDx implique la préparation de la librairie et le séquençage de multiples échantillons ainsi que des contrôles, le tout traité en même temps. L'étude de transfert des échantillons a été menée pour évaluer si les résultats faux positifs, dus à la contamination causée par le transfert de puit en puit lors de la préparation de la librairie d'échantillons, ainsi que la contamination de séquençage en séquençage entre deux séquençages consécutifs, impactent les résultats d'analyse. Les variants somatiques ont été utilisés car ils peuvent être détectés à des fréquences d'allèles plus faibles que les variants germinaux.

Les échantillons comprenaient quatre échantillons d'ADN génomique issus de ligne cellulaires, chacun contenant différents panels de mutations dans une analyse représentative sur deux gènes. Les échantillons étaient tels qu'une mutation à une position dans l'un deux aura une séquence de référence (sauvage) dans les autres.

Le transfert de cupule en cupule est défini comme un mode de défaillance potentiellement créé par des étapes de traitement manuel (pipetage, mélange des échantillons, etc.). Afin d'évaluer le transfert d'un puit d'échantillonnage à un autre, deux analyses ont été effectuées :

- Un damier d'un échantillon d'ADN génomique (ADNg) à apport élevé contenant une mutation du Gène 1 en alternance avec un échantillon d'ADNg à faible apport contenant une mutation du Gène 2.
- Un damier d'un échantillon d'ADNg à apport élevé contenant une mutation du Gène 2 en alternance avec un échantillon d'ADNg à faible apport contenant une mutation du Gène 1.

Dans chaque séquençage, un total de 12 répliques a été évalué pour les faux positifs (p. ex., mutation du Gène 1 détectée dans un puit désigné comme un échantillon de mutation du Gène 2, et inversement).

Le transfert de séquençage en séquençage est défini comme un mode de défaillance potentiellement créé par les résidus d'un séquençage précédent. Afin de déterminer si un transfert a lieu entre les séquençages, deux plateaux, chacun contenant 11 répliques d'un échantillon unique d'ADNg à apport élevé ainsi qu'un échantillon à blanc ont été préparés et séquencés de manière consécutive à l'aide d'un instrument MiSeqDx et évalués pour les faux positifs. Le premier séquençage portait sur 11 répliques de la mutation du Gène 2 et un échantillon à blanc. Le second séquençage portait sur 11 répliques de la mutation du Gène 1 et un échantillon à blanc. La librairie d'échantillons de la mutation du Gène 2 a été séquencée en premier, suivi d'un séquençage de la librairie d'échantillons de la mutation du Gène 1, suivi d'un nouveau séquençage de la librairie d'échantillons de la mutation du Gène 2. Si des mutations du Gène 2 sont observées dans le séquençage de la mutation du Gène 1 uniquement, et inversement, cela indiquerait qu'il y a eu transfert.

Aucun faux positif (0/24, 0 %) causé par le transfert de *puits en puits* n'a été signalé. Toutes les mutations prévues ont été détectées. Aucun faux positif (0/24, 0 %) causé par le transfert de *séquençage en séquençage* n'a été signalé. Toutes les mutations prévues ont été détectées. Aucun faux positif (0/48, 0 %) causé par le transfert *total* (transfert de puits en puits et de séquençage en séquençage combinés) n'a été signalé.

Caractéristiques de performances germinales

Les études décrites dans la présente ont utilisé le module Germline Variant (Variant germlinal) pour analyser les données de séquençage, excepté les études portant sur le panel sur un gène, pour lesquelles un module spécifique à l'analyse a été utilisé.

Précision

L'étude suivante a été menée pour évaluer la précision de l'instrument MiSeqDx avec le kit MiSeqDx Reagent Kit v3 et de l'ADN de haute qualité. L'étude a utilisé une analyse représentative conçue pour demander une variété de gènes couvrant 12 588 bases à travers 23 chromosomes différents à l'aide de 150 amplicons. Le chromosome Y ne contient pas de zone sûre et n'a pas été évalué. Les 12 échantillons uniques utilisés dans le cadre de cette étude viennent d'une même famille (deux parents et 10 enfants) fréquemment séquencés par de multiples laboratoires et méthodes de séquençage. Cinq échantillons provenaient de femmes et sept provenaient d'hommes. Chaque échantillon 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 définie. La séquence de la base de données de référence (projet Génomes Platines version 2016-01) a été dérivée de la combinaison de plusieurs méthodes de séquençage, de données publiques et de l'information héréditaire. Sauf indication contraire, les zones génomiques sûres ont été définies en fonction de cette méthode de référence. Au total, les échantillons ont été testés huit fois, les tableaux présentés pour illustrer la précision sont basés sur les données du premier séquençage.

Le [Tableau 1](#) contient les données de l'étude présentée avec les pourcentages de concordance positive et négative sur une base « par échantillon », où les résultats de variants sont comparés à la méthode composite de référence bien définie pour les calculs du PCP. Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Parce que la méthode de référence fournit uniquement les résultats pour les variants mononucléotidiques et les insertions/délétions, les résultats de la base non-variante sont comparés à la séquence du génome humain de référence hg19 pour les calculs du PCN.

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

Échantillon	Taux moyen de définitions	Nombre total de variants	Nombre total de variants VP	Nombre total de variants FN	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions VN	PCP	PCN	PCG
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100

Échantillon	Taux moyen de définitions	Nombre total de variants	Nombre total de variants VP	Nombre total de variants FN	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions VN	PCP	PCN	PCG
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

L'analyse représentative portait sur 150 amplicons conçus pour couvrir une variété de contenu génomique. Le contenu GC des amplicons était compris entre 26 et 87 %. Les amplicons comprenaient également des répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données ont été compilées sur une base par amplicon ([Tableau 2](#)) afin de déterminer l'impact du contenu génomique sur le pourcentage de définitions correctes. Le pourcentage de définitions correctes inclut les définitions de variants et de référence et est inférieur à 100 % s'il y a des définitions incorrectes ou des sans définitions. Les sans définitions se produisent lorsqu'un ou plusieurs filtres ne sont pas satisfaits pour la définition de variant (p. ex., couverture insuffisante).

Sur les huit variants FN du [Tableau 2](#), sept d'entre eux avaient une insertion de 1 pb sur l'amplicon 111, qui comprend également un homopolymère PolyA et un contenu génomique de 0,29. Le dernier FN (définition incorrecte) était dû à un SNV hétérozygote prévu sur l'amplicon 125 avec un contenu GC de 0,68, défini comme un variant homozygote. La fréquence du variant SNV était de 0,71, qui est supérieure au seuil de 0,70 pour la classification en tant que variant homozygote. L'amplicon ayant obtenu le pourcentage de définitions correctes le plus bas (98,2 %) était l'amplicon 17 avec 40 sans définitions et contenait des répétitions AT et un contenu GC de 27 %.

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

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	S.O.	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	S.O.	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	S.O.	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
24	4	15688604	15688681	78	78	S.O.	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	S.O.	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	S.O.	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	S.O.	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	S.O.	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
51	8	1817312	1817394	83	83	S.O.	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	S.O.	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	S.O.	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	S.O.	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	S.O.	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	S.O.	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	S.O.	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	S.O.	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	S.O.	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	S.O.	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	S.O.	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	S.O.	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	S.O.	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	2184	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	S.O.	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	S.O.	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	S.O.	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	S.O.	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	S.O.	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	S.O.	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	S.O.	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	S.O.	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	S.O.	0,52	1704	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 sans définitions sont résumés dans le [Tableau 3](#). Les filtres spécifiques qui ont résulté en sans définitions sont énumérés dans le tableau. L'insertion sur l'amplicon 111 a été filtrée pour neuf des 16 occurrences avec les sept occurrences restantes à titre de référence et sont donc des FN.

Tableau 3 Résumé des variants sans définitions

Nombre d'amplicons	Chr:Pos	Variant	Contenu de l'amplicon correspondant	Filtre	Variants manqués	Variants attendus	Définitions FN
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9 : Filtre de répétition. Un variant est filtré si tout le variant, ou une partie, est présente de façon répétée dans le génome de référence adjacent à la position du variant. Au moins neuf répétitions dans la référence sont nécessaires et seules les répétitions avec une longueur maximale de 5 pb sont prises en compte.

Les résultats du séquençage pour l'échantillon NA12878 ont été comparés à un génotype très sûr pour NA12878, établi par le National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Sur les 150 amplicons, 92 amplicons se trouvaient entièrement dans les zones génomiques très sûres, 41 amplicons se chevauchaient en partie, et 17 amplicons ne se chevauchaient pas dans la séquence NIST. Cela a résulté en 10 000 coordonnées par réplique pour la comparaison. Les définitions de bases non-variants ont été comparées à la séquence de référence du génome humain 19. Les résultats de précision sont indiqués dans le [Tableau 4](#).

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

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux moyen de définitions	Nombre total de variants VP	Nombre total de variants FN	Nombre total de définitions VN	Nombre total de définitions FP	PCP	PCN	PCG
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Les échantillons ont également été analysés pour définir des petites insertions et délétions (indels) ([Tableau 5](#)). Dans certains cas, l'indel était trouvée dans deux échantillons ou plus, comme le montre la colonne Nombre total de répliques d'échantillons avec Indel. Les résultats pour les deux répliques des 12 échantillons valables sont inclus dans le [Tableau 5](#). Nous avons trouvé un total de 71 indels d'une taille allant de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les délétions. 69 indels ont été détectées avec un pourcentage de concordance positive de 100 % chacune. Une délétion (amplicon 64 ; délétion de 2 pb (chr10 55892600 TAC>T) n'a eu aucune définition correcte parce que chacun de ces variants était sans définition en raison du filtre R5x9. Ainsi le PCP, qui exclut les sans définitions, n'a pas pu être calculé. Une autre indel, une insertion de 1 pb (chr17 39589692 C>CA on amplicon 111), n'a eu aucune définition correcte parce que neuf variants étaient sans définition en raison du filtre R5x9 et sept étaient des définitions FN.

Tableau 5 Résumé de la détection d'indels avec l'instrument MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
1	1	36450544	93	Délétion de 25 pb	GAAAATTTAATGAACACATTGTCCT>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

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
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	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>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	CTTTCACCTTCCCCTCATGCAAAG>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	TCTGGGGGGCAGCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
59	10	5987158	79	Délétion de 3 pb	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Délétion de 16 pb	AGCGTCTATAACCAAT>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	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>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	ATTATTTC>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>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
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>GATAAACTTTA	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

Répétabilité

Deux études ont été menées pour évaluer la répétabilité de l'instrument MiSeqDx avec des lignes cellulaires (études 1 et 2) ou de sang déleucocyté enrichi en lignes cellulaires (étude 2). Plusieurs instruments ont été utilisés dans le cadre de l'étude 1. L'étude 2 s'est déroulée dans plusieurs centres.

Étude 1

La répétabilité de l'instrument MiSeqDx a été déterminée à l'aide de deux instruments, deux opérateurs et deux lots de réactifs pour un total de huit séquençages. L'analyse représentative, les échantillons et la méthode de référence sont les mêmes que ceux décrits pour l'étude de précision.

Les résultats sont présentés sur une base par amplicon pour chaque instrument ([Tableau 6](#)) pour illustrer la répétabilité des définitions sur l'ensemble des instruments. Le pourcentage de définitions correctes comprenait les définitions incorrectes et les sans définitions (un ou plusieurs filtres ne sont pas satisfaits pour la définition de variants). Les instruments ont généré des nombres de sans définitions et de définitions incorrectes similaires en fonction de l'amplicon spécifique.

Tableau 6 Résultats de l'étude de répétabilité instrument par instrument pour l'instrument MiSeqDx (niveau de l'amplicon)

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	S.O.	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	S.O.	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	S.O.	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	22333667	22333744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	S.O.	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	S.O.	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	S.O.	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	S.O.	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	S.O.	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	S.O.	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	S.O.	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	S.O.	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	S.O.	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	S.O.	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	S.O.	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	S.O.	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	S.O.	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	S.O.	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	S.O.	0,52	7008	0	0	7008	0	0

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	S.O.	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	S.O.	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	S.O.	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	S.O.	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	S.O.	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	S.O.	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	S.O.	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	S.O.	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	S.O.	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	S.O.	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	S.O.	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	S.O.	0,52	6816	0	0	6816	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 répétabilité ont été analysés sur une base par opérateur à l'aide de la fréquence de variant ([Tableau 7](#)). Cette analyse a prouvé que les fréquences de variant étaient cohérentes peu importe l'opérateur. Les fréquences de variant moyennes +/- la déviation standard sont présentées.

Tableau 7 Résultats opérateur par opérateur pour l'instrument MiSeqDx

Plage de fréquences de variant	Nombre de variants uniques	Nombre total de variants analysés Opérateur 1	Nombre total de variants analysés Opérateur 2	Fréquence de variant moyenne signalée (SD) Opérateur 1	Fréquence de variant moyenne signalée (SD) Opérateur 2
Homozygote (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Hétérozygote (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Les résultats de l'étude de répétabilité pour chaque échantillon indiqués proviennent des huit séquençages (Tableau 8). La détection est évaluée pour chaque type de variant : les SNV, les insertions et les délétions séparément. Les positions référencées sont exclues. Cette analyse a démontré que les résultats pour les variants sont répétables sur l'ensemble des échantillons.

Tableau 8 Concordance des résultats des définitions de bases de l'instrument MiSeqDx par échantillon

Échantillon	SNV				Insertions				Délétions			
	Nombre total	Nombre total de VP	Nombre total de F	Nombre total de F	Nombre total de F	Nombre total de VP	Nombre total de FP	Nombre total de FN	Nombre total	Nombre total de VP	Nombre total de FP	Nombre total de FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	0	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	0
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Les données issues des huit séquençages dans cette étude de répétabilité étayent les affirmations selon lesquelles l'instrument MiSeqDx peut séquencer avec cohérence :

- Le contenu GC \geq 19 % (toutes les bases définies dans 192 sur 192 amplicons séquencés avec un contenu de 19 % de GC définis correctement avec un taux de sans définitions de 1,1 %)
- Le contenu GC \geq 78 % (toutes les bases définies dans 192 sur 192 amplicons séquencés avec un contenu de 78 % de GC définis correctement avec zéro sans définition)
- Les longueurs PolyA \leq 8 (la répétition PolyA de 8 nucléotides a été correctement définie dans 192 sur 192 amplicons séquencés contenant le PolyA = 8)
- Les longueurs PolyT \leq 10 (la répétition PolyT de 10 nucléotides a été correctement définie dans 192 sur 192 amplicons séquencés contenant le PolyT = 10)
- Les longueurs PolyG \leq 7 (la répétition PolyG de 7 nucléotides a été correctement définie dans 192 sur 192 amplicons séquencés contenant le PolyG = 7)
- Les longueurs PolyC \leq 6 (la répétition PolyC de 6 nucléotides a été correctement définie dans 576 sur 576 amplicons séquencés contenant le PolyC = 6)
- Les longueurs de répétitions de dinucléotides \leq 11x (toutes les bases définies dans 192 sur 192 amplicons séquencés avec 11 répétitions de dinucléotides ont été correctement définies avec un taux de sans définitions de 0,5 %)
- Les longueurs de répétitions de trinucléotides \leq 5x (toutes les bases définies dans 192 sur 192 amplicons séquencés avec 5 répétitions de trinucléotides ont été correctement définies avec un taux de sans définitions de 0,5 %)
- 24 insertions de base ou moins et 25 délétions de base ou moins
 - 24 insertions de base correctement définies dans 192 sur 192 échantillons
 - 25 délétions de base correctement définies dans 223 échantillons et définitions manqués dans 1 échantillon sur 224

Étude 2

Une étude de répétabilité de centre en centre menée avec une analyse représentative, Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay, portait sur un sous-ensemble de mutations génétiques de *CFTR* pertinentes du point de vue clinique analysées à l'aide du logiciel MiSeq Reporter avec le séquençage d'ADN ciblé de la plateforme MiSeq Dx. L'étude en aveugle a été réalisée dans 3 centres d'étude avec 2 opérateurs par centre. Deux panels bien définis de 46 échantillons ont été testés par chacun des opérateurs dans chaque centre pour un total de 810 définitions par centre. Les panels contenaient un mélange d'ADN génomique issus de lignes

cellulaires avec des variants connus du gène *CFTR* ainsi que du sang déleucocyté et enrichi en lignes cellulaires avec des variants connus du gène *CFTR*. Les échantillons de sang ont été fournis de façon à permettre l'incorporation des étapes d'extraction utilisées pour préparer l'ADNg servant comme apport principal pour l'analyse. Le taux de réussite des échantillons, défini comme le nombre d'échantillons passant les métriques de CQ dès la première tentative, était de 99,88 %. Tous les résultats d'analyse sont basés sur la première analyse.

Tableau 9 Résumé des résultats de l'étude de répétabilité effectuée à l'aide d'une analyse représentative MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Nombre d'échantillons	Génotype de l'échantillon	Variants	Total de définitions par site	Définitions à concordance positive (Variants)			Définitions à concordance négative (Sauvages)			Nombre de définitions manquées	Nombre de sans définitions	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Centre 1	Centre 2	Centre 3	Centre 1	Centre 2	Centre 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 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	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 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
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

Panel	Nombre d'échantillons	Génotype de l'échantillon	Variants	Total de définitions par site	Définitions à concordance positive (Variants)			Définitions à concordance négative (Sauvages)			Nombre de définitions manquées	Nombre de sans définitions	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Centre 1	Centre 2	Centre 3	Centre 1	Centre 2	Centre 3					
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
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	WT		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

Panel	Nombre d'échantillons	Génotype de l'échantillon	Variants	Total de définitions par site	Définitions à concordance positive (Variants)			Définitions à concordance négative (Sauvages)			Nombre de définitions manquées	Nombre de sans définitions	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Centre 1	Centre 2	Centre 3	Centre 1	Centre 2	Centre 3					
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	WT		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	WT		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
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

Panel	Nombre d'échantillons	Génotype de l'échantillon	Variants	Total de définitions par site	Définitions à concordance positive (Variants)			Définitions à concordance négative (Sauvages)			Nombre de définitions manquées	Nombre de sans définitions	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Centre 1	Centre 2	Centre 3	Centre 1	Centre 2	Centre 3					
B	50	WT		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	394delTT (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
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
B	57	WT		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	WT		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	WT		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	WT		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

Panel	Nombre d'échantillons	Génotype de l'échantillon	Variants	Total de définitions par site	Définitions à concordance positive (Variants)			Définitions à concordance négative (Sauvages)			Nombre de définitions manquées	Nombre de sans définitions	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Centre 1	Centre 2	Centre 3	Centre 1	Centre 2	Centre 3					
B	70	WT		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 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	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	WT		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 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Nombre d'échantillons	Génotype de l'échantillon	Variants	Total de définitions par site	Définitions à concordance positive (Variants)			Définitions à concordance négative (Sauvages)			Nombre de définitions manquées	Nombre de sans définitions	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Centre 1	Centre 2	Centre 3	Centre 1	Centre 2	Centre 3					
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S.O.	100	100
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		74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ L'emplacement du variant sauvage correspondant au variant N1303K pour une réplique a été signalé comme sans définition en raison d'une couverture insuffisante.

² Une réplique des échantillons 5 et 75 a eu un taux de définition de 0 %. Des recherches supplémentaires indiquent que les échantillons n'ont peut-être pas été ajoutés au plateau d'échantillons avant la préparation de la librairie parce que les volumes d'échantillons restant dans les tubes indiquaient qu'aucun volume n'avait été retiré.

³ Des preuves indiquent que les échantillons 9 et 10 ont probablement été échangés par l'opérateur avant la préparation de la librairie.

⁴ L'emplacement du variant sauvage correspondant au variant M1V pour une réplique de deux échantillons a été signalé comme sans définition en raison d'une couverture insuffisante.

Caractéristiques de performances somatiques

Les études décrites dans la présente ont utilisé le module Somatic Variant (Variant somatique) pour analyser les données de séquençage, excepté les études portant sur le panel sur deux gènes, pour lesquelles un module spécifique à l'analyse a été utilisé.

Précision

Trois études ont été menées pour évaluer la précision de l'instrument MiSeqDx avec de l'ADN extrait d'échantillons FFIP.

Étude 1

L'étude a utilisé une analyse représentative conçue pour demander une variété de gènes couvrant 12 588 bases à travers 23 chromosomes différents à l'aide de 150 amplicons. Le chromosome Y ne contient pas de zone sûre et n'a pas été évalué.

Les cinq échantillons uniques utilisés dans le cadre de cette étude viennent d'une même famille (deux parents et trois enfants)

fréquemment séquencés par de multiples laboratoires et méthodes de séquençage. Trois échantillons provenaient de femmes et deux provenaient d'hommes. Tous les échantillons ont été fixés au formol et incorporés dans de la paraffine avant l'extraction de l'ADN pour l'étude. L'échantillon GM12877 a été dilué, au niveau de l'ADN, avec l'échantillon GM12878 pour créer l'échantillon GM12877-D et constituer un ensemble de variants avec des fréquences proches de 5 % et 10 %. Chaque échantillon a été testé en double excepté GM12877-D, qui a été testé avec cinq répliques. 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 définie. La séquence de la base de données de référence (projet Génomes Platines version 2016-01) a été dérivée de la combinaison de plusieurs méthodes de séquençage, de données publiques et de l'information héréditaire. Sauf indication contraire, les zones génomiques sûres ont été définies en fonction de cette méthode de référence. Au total, les échantillons ont été séquencés huit fois. Les tableaux présentés pour illustrer la précision sont basés sur les données du premier séquençage.

Le [Tableau 10](#) contient les données de l'étude présentée avec les pourcentages de concordance positive et négative sur une base « par échantillon », où les résultats de variants sont comparés à la méthode composite de référence bien définie pour les calculs du PCP. Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Parce que la méthode de référence fournit uniquement les résultats pour les variants mononucléotidiques et les insertions/délétions, les résultats de la base non-variante sont comparés à la séquence du génome humain de référence hg19 pour les calculs du PCN.

Tableau 10 Concordance des résultats des définitions de bases de l'instrument MiSeqDx avec les données de référence pour 6 échantillons bien définis

Échantillon	Taux moyen de définitions	Nombre total de variants	Nombre total de variants VP	Nombre total de variants FN	Nombre total de définitions VN	PCP	PCN	PCG
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D ¹		675	650	0		100	100	100
GM12877-D ²	98,4	155	155	0	57608	100	100	100

¹ Variants avec une fréquence supérieure à 20 %.

² Variant avec une fréquence inférieure à 20 %.

Les 150 amplicons ont été conçus pour couvrir une variété de contenu génomique. Le contenu GC des amplicons était compris entre 26 et 87 %. Les amplicons comprenaient également des répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucleotides. 6 échantillons uniques ont été utilisés dans le cadre de l'analyse. Les données ont été compilées sur une base par

amplicon (Tableau 11) afin de déterminer l'impact du contenu génomique sur le pourcentage de définitions correctes. Le pourcentage de définitions correctes inclut les définitions de variants et de référence et est inférieur à 100 % s'il y a des définitions incorrectes ou des sans définitions. Les sans définitions se produisent lorsqu'un ou plusieurs filtres ne sont pas satisfaits pour la définition de variant (p. ex., couverture insuffisante). Aucune définition incorrecte n'a été détectée. Le nombre de sans définitions variaient considérablement parmi les amplicons. Le contenu GC et plusieurs interactions avec le contenu GC étaient les principaux indicateurs de sans définitions. 2 040/2 580 (79 %) des sans définitions étaient dus au fait que la spécification de couverture n'était pas respectée. Les amplicons avec un contenu GC supérieur à 78 % ont causé le plus de sans définitions. Un amplicon représentatif avec 78 % de contenu GC avait un total de 675 sans définitions. Un amplicon représentatif avec 87 % de contenu GC avait un total de 1 365 sans définitions. La couverture peut être augmentée en réduisant le nombre d'échantillons chargé dans la cellule de débit. Cela peut permettre une détection sur les amplicons avec un contenu GC plus élevé.

Tableau 11 Données de précision au niveau de l'amplicon

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	S.O.	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	S.O.	0,43	1395	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	S.O.	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	S.O.	0,29	1169	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	1035	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	1260	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	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	S.O.	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	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	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	S.O.	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	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	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	S.O.	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	S.O.	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	S.O.	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
69	11	47470345	47470444	100	100	S.O.	0,65	1500	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	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	S.O.	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	S.O.	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	S.O.	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	S.O.	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	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	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	S.O.	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	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	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	S.O.	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	00,45	1275	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Pourcentage de définitions correctes
123	18	59773996	59774060	65	65	S.O.	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	S.O.	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	S.O.	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	S.O.	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	S.O.	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	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	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	S.O.	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	S.O.	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	S.O.	0,52	1065	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 sans définitions sont résumés dans le [Tableau 12](#). Les filtres spécifiques qui ont résulté en sans définitions sont énumérés dans le tableau.

Tableau 12 Résumé des variants sans définitions

Nombre d'amplicons	Chr.Pos	Variant	Contenu de l'amplicon correspondant	Filtre	Variants manqués	Variants attendus
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61% GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (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

¹ LowDP : Faible couverture. Un variant est filtré si la profondeur d'au moins un des groupes à cette position spécifique est inférieure à 900.

² R3x6 : Filtre de répétition. Un variant est filtré si tout le variant, ou une partie, est présente de façon répétée dans le génome de référence adjacent à la position du variant. Au moins six répétitions dans la référence sont nécessaires et seules les répétitions avec une longueur maximale de 3 pb sont prises en compte.

Les résultats du séquençage pour l'échantillon ont été comparés à un génotype très sûr pour NA12878, établi par le National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Sur les 150 amplicons, 92 amplicons se trouvaient entièrement dans les zones génomiques très sûres, 41 amplicons se chevauchaient en partie, et 17 amplicons ne se chevauchaient pas dans la séquence NIST. Cela a résulté en 10 000 coordonnées par réplique pour la comparaison. Les définitions de bases non-variants ont été comparés à la séquence de référence du génome humain hg19. Les résultats de précision sont indiqués dans le [Tableau 13](#).

Tableau 13 Concordance des résultats des définitions de bases de l'instrument MiSeqDx avec la référence NIST pour l'échantillon GM12878

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux moyen de définitions	Nombre total de définitions de variants VP	Nombre total de définitions de variants FN	Nombre total de définitions VN	Nombre total de définitions FP	PCP	PCN	PCG
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Les cinq échantillons non dilués ont également été analysés pour définir des petites insertions et délétions (indels) ([Tableau 14](#)). Dans certains cas, l'indel était trouvée dans deux échantillons ou plus, comme le montre la colonne Nombre total de répliques d'échantillons avec Indel. Les résultats pour les deux répliques des cinq échantillons sont inclus dans le [Tableau 14](#). Nous avons trouvé un total de 71 indels d'une taille allant de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les délétions. 68 indels ont été détectées avec un pourcentage de concordance positive de 1 % chacune. Trois insertions et délétions n'ont eu aucune définition correcte parce que

chacun de ces variants était sans définition en raison du filtre R3x6. Ainsi le PCP, qui exclut les sans définitions, n'a pas pu être calculé. Les trois variants étaient 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 d'indels avec l'instrument MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
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	CTTTCACCTTCCCCTCATGCAAAG>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

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
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	TCTGGGGGGCAGCCCCCTGAGGG>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	AGCGTCTATAACCAAT>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>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	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	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>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	ATTATTTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Délétion de 1 pb	TG>T	13	0	0	13	100

Amplicon	Chromosome	Position	Taille du fragment analysé	Type et longueur de l'indel dans l'amplicon	Indel	Nombre total de répliques d'échantillons avec indel	Nombre de sans définitions	Nombre total de définitions d'indel incorrectes	Nombre total de définitions d'indel correctes	PCP
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	TTTGATCTGCTG>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>GATAAACTTTA	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 FFIP du cancer colorectal mis en librairie et a utilisé une analyse représentative sur deux gènes, qui a été comparée à la méthode de référence, le séquençage bidirectionnel avec la méthode de Sanger (Sanger). Parmi les 1 183 sujets, 441 ont eu des résultats valables pour la méthode de Sanger et l'analyse représentative. Lorsque évalués au niveau du sujet, (Tableau 15), 230 des 441 sujets étaient positifs à la méthode de Sanger (mutation détectée par Sanger). L'analyse représentative en a testé 227 positifs. Les 211 sujets restants sur 441 étaient négatifs à la méthode de Sanger (aucune mutation détectée par la méthode de Sanger). L'analyse représentative en a testé 206 négatifs. Cela a donné un pourcentage de concordance positive (PCP) de 98,7 % et un pourcentage de concordance négative (PCN) de 97,6 % (Tableau 15).

Tableau 15 Pourcentage de concordance positive et négative des résultats au niveau du sujet

Analyse représentative	Sanger		Total
	Positifs	Négatifs	
Positifs	227 ¹	5	232
Négatifs	3 ²	206	209
Total	230	211	441

Résumé des performances		
Statistiques de concordance	Estimation ponctuelle	IC 95 % exact
PCP	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
PCN	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹244 concordances parfaites ont été détectées pour les résultats à tous les niveaux de mutation dans le sujet. Pour deux sujets, MiSeqDx a détecté la mutation détectée par la méthode de Sanger et une mutation supplémentaire. Pour un sujet, MiSeqDx et la méthode de Sanger ont détecté des mutations différentes.

²Pour un sujet, la méthode de Sanger a détecté deux mutations. Pour deux sujets, la méthode de Sanger a détecté une mutation.

Étude 3

Cette étude a évalué des bibliothèques d'ADN préparées avec des spécimens FFIP provenant de différents types de tissus. Un total de 109 spécimens FFIP provenant de huit tissus différents (côlon, ovaire, pancréas, glande surrénale, vessie, foie, thyroïde et sein) avec au moins 11 spécimens FFIP représentant chaque type de tissu. Les tissus surrénaux comprenaient la métastase de tumeurs de l'œsophage, des poumons et du côlon. Les autres tissus comprenaient des tumeurs primaires. Cette étude a utilisé une analyse représentative conçue pour demander 26 gènes couvrant 21 577 bases à travers 17 chromosomes différents. Un total de six gènes différents (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* et *BRAF*) a été séquencé avec la méthode de Sanger, chaque tumeur ayant entre 1 et 3 gènes séquencés avec la méthode de Sanger en fonction de la prévalence attendue de mutations somatiques pour cette tumeur. Le séquençage avec la méthode de Sanger a identifié 39 mutations somatiques SNV dans 33 des 109 spécimens FFIP. L'instrument MiSeqDx a identifié 36 mutations somatiques SNV dans 32 des 109 spécimens FFIP avec un faux négatif et deux positions de variants

« sans définitions ». Le PCP était de 97,3 %. L'instrument MiSeqDx a identifié 78 975 bases de référence parmi les 109 spécimens FFIP avec 29 faux positifs par rapport au séquençage avec la méthode de Sanger et 2 437 sans définitions. Le PCN était de 99,9 %. Une délétion à deux bases était concordante entre les deux méthodes. Le [Tableau 16](#) résume les résultats par type de tissu.

Tableau 16 Pourcentage de concordance positive et négative par type de tissu

Type de tissu	Nombre d'échantillons	Nombre total de variants	Nombre total de variants VP	Nombre total de variants FN	Nombre total de définitions VN	Nombre total de définitions FP	Nombre total de sans définitions	PCP	PCN
Glande surrénale	16	6	4	1	11823	2	607	80	> 99,9
Vessie	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Sein	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Côlon	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Foie	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Ovaire	13	7	7	0	10581	1	724	100	> 99,99
Pancréas	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Thyroïde	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Total	109	39	36	1	78974	29	3416	97,3	> 99,9

Répétabilité

Deux études ont été menées pour évaluer la répétabilité de l'instrument MiSeqDx avec de l'ADN extrait d'échantillons FFIP. Plusieurs instruments ont été utilisés dans le cadre de l'étude 1. L'étude 2 s'est déroulée dans plusieurs centres.

Étude 1

La répétabilité de l'instrument MiSeqDx a été déterminée à l'aide de deux instruments et deux opérateurs qualifiés pour un total de huit séquençages. L'analyse représentative, le contexte génomique de l'amplicon, les échantillons et la méthode de référence sont les mêmes que ceux décrits pour l'étude 1 de précision ci-dessus. Les résultats sont présentés sur une base par amplicon pour chaque instrument ([Tableau 17](#)) pour illustrer la répétabilité des définitions sur l'ensemble des instruments. Le pourcentage de définitions correctes comprenait les définitions incorrectes et les sans définitions (un ou plusieurs filtres ne sont pas satisfaits pour la définition de variants). Les instruments ont généré des nombres de sans définitions similaires en fonction de l'amplicon spécifique. Seule une

définition incorrecte dans une zone sûre telle que définie par la référence du projet Génomes Platines a été observée pour l'instrument MiSeqDx 1. La définition incorrecte était un faux positif d'une insertion dans l'amplicon 64 demandant le chromosome 10 aux positions 55892599 à 55892687. L'amplicon comportait une répétition de dinucléotides de 11.

Tableau 17 Résultats de l'étude de répétabilité instrument par instrument pour l'instrument MiSeqDx (niveau de l'amplicon)

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	S.O.	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	S.O.	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	S.O.	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	S.O.	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	S.O.	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	S.O.	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	S.O.	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	S.O.	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	S.O.	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	S.O.	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	S.O.	0,49	4800	0	0	4800	0	0

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
66	10	81	81	S.O.	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	S.O.	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	S.O.	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	S.O.	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	S.O.	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	S.O.	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	S.O.	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	S.O.	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	S.O.	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	S.O.	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	S.O.	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	S.O.	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	S.O.	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	S.O.	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	S.O.	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	S.O.	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé	Bases dans les zones sûres	Contenu génomique de l'amplicon	Contenu GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions	Nombre total de définitions correctes	Nombre total de définitions incorrectes	Nombre total de sans définitions
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	S.O.	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	S.O.	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	S.O.	0,52	4260	0	0	4260	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 répétabilité ont été analysés sur une base par opérateur à l'aide de la fréquence de variant ([Tableau 18](#)). Cette analyse a prouvé que les fréquences de variant étaient cohérentes peu importe l'opérateur. Les fréquences de variant moyennes +/-1 la déviation standard sont présentées.

Tableau 18 Résultats opérateur par opérateur pour l'instrument MiSeqDx

Plage de fréquences de variant	Nombre de variants uniques	Nombre total de variants analysés Opérateur 1	Nombre total de variants analysés Opérateur 2	Fréquence de variant moyenne signalée (SD) Opérateur 1	Fréquence de variant moyenne signalée (SD) Opérateur 2
Haute-Fréquence (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Moyenne-Fréquence (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Basse-Fréquence (3 à 7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Les résultats de l'étude de répétabilité pour chaque échantillon indiqués proviennent des huit séquençages (Tableau 19). La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant : les SNV, les insertions et les délétions séparément. Les positions référencées sont exclues. Cette analyse a démontré que les résultats pour les variants sont répétables sur l'ensemble des échantillons.

Tableau 19 Concordanance des résultats des définitions de bases de l'instrument MiSeqDx par échantillon

Échantillon	SNV				Insertions				Délétions			
	Nombre total	Nombre total de VP	Nombre total de FP	Nombre total de FN	Nombre total	Nombre total de VP	Nombre total de FP	Nombre total de FN	Nombre total	Nombre total de VP	Nombre total de FP	Nombre total de FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹Variants avec une fréquence supérieure à 20 %.

²Variant avec une fréquence inférieure à 20 %.

Les données issues des 8 séquençages dans cette étude de répétabilité étayent les affirmations selon lesquelles l'instrument MiSeqDx peut séquençer avec cohérence :

- Le contenu GC \geq 19 % (toutes les bases définies dans 120 amplicons séquençés sur 120 avec un contenu de 19 % de GC définis correctement avec un taux de sans définitions de 3,4 %)
- Le contenu GC \leq 73 % (toutes les bases définies dans 120 amplicons séquençés sur 120 avec un contenu de 73 % de GC définis correctement avec un taux de sans définitions de 0,1 %)
- Les longueurs PolyA \leq 8 (la répétition PolyA de 8 nucléotides a été correctement définie dans 120 amplicons séquençés sur 120 contenant le PolyA = 8)
- Les longueurs PolyT \leq 10 (la répétition PolyT de 10 nucléotides a été correctement définie dans 120 amplicons séquençés sur 120 contenant le PolyT = 10)

- Les longueurs PolyG ≤ 6 (la répétition PolyG de 6 nucléotides a été correctement définie dans 720 amplicons séquencés sur 720 contenant le PolyG = 6)
- Les longueurs PolyC ≤ 6 (la répétition PolyC de 6 nucléotides a été correctement définie dans 359 amplicons séquencés sur 360 contenant le PolyC = 6 avec 1 sans définition)
- Les longueurs de répétitions de dinucléotides $\leq 4x$ (toutes les bases définies dans 600 sur 600 amplicons séquencés avec 4 répétitions de dinucléotides ont été correctement définies avec un taux de sans définitions de 0,4 %)
- Les longueurs de répétitions de trinucléotides $\leq 5x$ (toutes les bases définies dans 120 amplicons séquencés sur 120 avec 5 répétitions de trinucléotides ont été correctement définies avec un taux de sans définitions de 1,9 %)
- 24 insertions de base ou moins et 25 délétions de base ou moins
 - 24 insertions de base correctement définies dans 120 échantillons sur 120
 - 25 délétions de base correctement définies dans 182 échantillons et signalées comme sans définitions dans 2 échantillons sur 184

Étude 2

Une étude externe a été réalisée afin d'évaluer la répétabilité de l'analyse représentative sur deux gènes, décrite dans l'étude 2 portant sur la précision, dans trois centres externes d'analyses (deux opérateurs par site), sur un lot de réactifs et trois jours non-consécutifs d'analyses. Six panels d'échantillons bien définis d'ADN génomique à partir de spécimen ou lignes cellulaires FFIP ont été analysés. Chaque panel comportait 10 membres, pour un total de 60 membres au total.

Les 60 membres du panel comprenaient les répliques de quatre spécimens sauvages (pour les mutations du panel), 12 spécimens mutants uniques (avec une seule mutation) préparés à des fréquences de mutation faibles et élevées et deux spécimens mutants uniques (avec une seule mutation) préparés à une fréquence de mutation faible uniquement. Chaque spécimen/échantillon de niveau de fréquence de mutation unique (testé en double à chaque séquençage) avait 36 résultats possibles (2 répliques \times 2 opérateurs \times 3 jours \times 3 centres) si tous les résultats étaient valables.

Le pourcentage de définitions prévues (PDP) entre tous les variants positifs et négatifs a été évalué en comparant le résultat de l'analyse représentative au résultat de mutation prévue (mutation prévue détectée ou non) pour chaque échantillon. Le PDP est calculé comme 100 % multiplié par le nombre de définitions prévues divisé par le nombre de tentatives de définition. L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

En prenant tous les centres en considération, les taux de succès des échantillons étaient de $\geq 94,7\%$ pour le premier séquençage de l'échantillon ou pour les échantillons testés dans des séquençages qui étaient valables dès le départ. Le PDP au niveau de la mutation parmi les échantillons mutants était de $99,6\%$ (905/909) (IC 95% ; 98,9, 99,8). Le nombre de tentatives de définition parmi les 56 mutations du panel (que la mutation détectée ait été prévue ou non) pour tous les échantillons valables était de 58,856 ($56 \times 1\,051$). Sur ces 58 856 observations au niveau de la mutation, il n'y a eu que six incidents où les résultats observés et prévus ne concordent pas. Le PDP au niveau de la mutation parmi tous les variants positifs et négatifs de tous les membres du panel mutant et sauvage combinés était de $99,99\%$ (58 850/58 856).

Sensibilité analytique (Limite du blanc [LB] et Limite de détection [LD])

Cette étude a vérifié le seuil de l'analyse et a déterminé la Limite de détection (LD) pour l'instrument MiSeqDx avec un panel représentatif. En bref, les lignes cellulaires GM12878 et GM12877 bien définies du projet Génomes Platines ont été fixées au formol et incorporées dans de la paraffine, puis l'ADN en a été extrait. GM12878 a été dilué avec GM12877 de façon à ce que les fréquences de variant de 70 variants (52 SNV, neuf insertions et neuf délétions) soient proches de 0,05. Les deux échantillons d'ADN ont été testés par deux opérateurs à l'aide de deux instruments et de deux lots de réactifs, pour un total de 10 séquençages avec l'instrument MiSeqDx. Cela a entraîné un résultat de 40 répliques de chaque variant dans GM12878 et de 60 répliques de chaque coordonnée sauvage correspondante dans GM12877 pour chaque lot de réactifs. Les LB et LD ont été calculées grâce à l'approche classique prévue dans CLSI EP17-A2 à l'aide de l'option non-paramétrique. Les LB et LD ont été calculées pour les SNV, les insertions et les délétions séparément en regroupant les fréquences de variant pour un type de variant donné. L'erreur de Type I a été définie à 0,01 et l'erreur de Type II a été définie à 0,05.

Pour la LB, les fréquences de variant regroupées ont été triées de la plus faible à la plus élevée, et la 99^e position pour chaque lot de réactifs pour chaque type de variant a été calculée ([Tableau 20](#)). Le logiciel MiSeqDx utilise un seuil (LB réelle) d'une fréquence de variant de 0,026 afin de déterminer la détection qualitative des variants. Les limites du blanc calculées ont confirmé que ce seuil entraîne une erreur de Type I inférieure à 0,01.

Tableau 20 Limite du blanc

Type de variant	Nombre total de fréquences de variant	LB Lot de réactifs 1 (%)	LB Lot de réactifs 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Insertion	540	0,79	0,60
Délétion	540	0,96	0,84

Pour la LD, le pourcentage de fréquence de mutation individuelle pour chaque lot de réactifs pour chaque type de variant se trouvant en-dessous du seuil de 0,026 a été calculé (Tableau 21). Parce que les pourcentages étaient inférieurs à l'erreur de Type II de 5 % (0,05), la médiane des fréquences de variant a été calculée comme la LD (Tableau 22). La plus grande valeur des deux valeurs calculées a été choisie comme LD 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 variant	Nombre de mesures FV < 2,6 %	Pourcentage de mesures FV < 2,6 %	Limite de détection (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Insertion	360	0	0,00	4,86
	Délétion	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Insertion	360	0	0,00	4,88
	Délétion	360	0	0,00	5,24

Les études suivantes illustrent les caractéristiques de performances de l'instrument MiSeqDx avec une autre analyse représentative ciblant 56 mutations dans deux gènes du cancer cliniquement pertinents (panel de mutations). Le panel de mutations est conçu pour détecter 56 mutations en particulier dans deux gènes du cancer cliniquement pertinents (Gène 1 et Gène 2). L'analyse détermine simultanément la présence ou l'absence de chacune des 56 mutations dans chaque échantillon séquencé. La méthode de référence utilisée dans ces études était le séquençage bidirectionnel avec la méthode de Sanger.

Précision Lot par Lot

Une étude de précision lot par lot a été menée pour évaluer les performances de l'instrument MiSeqDx avec des lots de réactifs manufacturés (comprenant la qualification des échantillons, la préparation de la librairie et les réactifs de séquençage) à l'aide d'une analyse représentative sur deux gènes sur un panel de cinq spécimens FFIP mélangés répondant aux exigences de qualification des échantillons. Chaque spécimen FFIP présentait deux mutations uniques : une à un niveau de fréquence de mutation plus faible (environ 8 %) et une à un niveau de fréquence de mutation plus élevé (environ 14 %). Douze (12) observations de chacun des cinq mélanges de spécimens ont été collectées au cours de trois jours non-consécutifs avec trois lots de réactifs. Le nombre total d'observations pour l'étude sur tous les lots de réactifs était de 180 observations sur tous les mélanges de spécimens et 360 observations sur tous les

niveaux de fréquence de mutation. Sur tous les lots et jours, 99,7 % (359/360) des observations ont illustré le résultat de mutation prévue. Une mutation basse fréquence n'a pas été correctement définie comme sauvage. Une analyse des composants de la variance a été effectuée pour chacune des mutations/chacun des niveaux de fréquence de mutation afin d'estimer la variabilité du système. La déviation standard totale était comprise entre 0,011 et 0,029. Le composant Lot de réactifs de la déviation standard totale était compris entre 0 et 0,015.

Historique des modifications

Document n°	Date	Description de la modification
Document n° 200006218 v01	Mai 2022	Ajout de la notice du kit MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro CN à la section Équipement et matériel fournis, non requis. Ajout d'informations sur les tests pour le kit MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro à la section Caractéristiques de performance. Suppression de la note d'avertissement spécifique aux États-Unis des Avertissements et Précautions.
Document n° 200006218 v00	Novembre 2021	Version originale modifiée pour inclure la prise en charge de MOS v4.0 et Local Run Manager v3.0.

Brevets et Marques

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et ses filiales (« Illumina »), et sont destinés à un usage contractuel de ses clients en lien avec l'utilisation du ou des produits décrits dans la présente et à aucune autre utilisation. Ce document et son contenu ne seront pas utilisés ou distribués dans tout autre but et/ou autrement communiqués, divulgués ou reproduits de quelque manière que ce soit sans l'autorisation préalable et écrite d'Illumina. Par le biais de ce document, Illumina ne fournit aucune licence sur ses droits de brevets, de marques, de copyrights ou tout autre droit de fait, ni n'en fournit sur de tels droits de tierces parties.

Les instructions présentes dans ce document doivent être strictement et explicitement respectées par le personnel qualifié et correctement formé afin d'assurer une utilisation correcte et sécuritaire du ou des produits décrits dans la présente. Tout le contenu de ce document doit être entièrement lu et compris avant d'utiliser le ou les produits.

LE DÉFAUT DE LIRE ET RESPECTER EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LA PRÉSENTE PEUT CAUSER DES DOMMAGES AU OU AUX PRODUITS, DES BLESSURES AUX PERSONNES, Y COMPRIS LES UTILISATEURS OU D'AUTRES PERSONNES, ET DES DOMMAGES À D'AUTRES BIENS, ET ANNULERA TOUTE GARANTIE APPLICABLE AU OU AUX PRODUITS.

ILLUMINA N'EST PAS RESPONSABLE DE TOUT DOMMAGE CAUSÉ PAR UNE MAUVAISE UTILISATION DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LA PRÉSENTE (Y COMPRIS LES PARTIES DE CELLE-CI OU LE LOGICIEL).

© 2022 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs propriétaires respectifs. Pour plus d'informations sur les marques, consultez www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 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



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Pays-Bas

Étiquette du produit

Pour obtenir des informations détaillées sur les symboles susceptibles d'apparaître sur l'emballage et l'étiquette du produit, consultez la légende des symboles pour votre kit à l'adresse support.illumina.com.