

# Instrument MiSeqDx<sup>MD</sup>

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

N° de référence DX-410-1001

## Utilisation prévue

Illumina MiSeqDx est un instrument de séquençage qui mesure les signaux de fluorescence des nucléotides marqués par l'entremise de réactifs et de Flow Cell propres à l'instrument (trousse universelle MiSeqDx 1.0), de matériel d'imagerie et d'un logiciel d'analyse de données. La plateforme MiSeqDx est destinée au séquençage d'ADN génomique humain provenant d'échantillons de sang total périphérique. La plateforme MiSeqDx n'est pas destinée au séquençage de génome entier ou de novo.

## Principes procéduraux

L'instrument MiSeqDx d'Illumina est destiné au reséquençage ciblé d'ADN génomique humain provenant d'échantillons de sang total périphérique à l'aide des consommables fournis par Illumina. L'ADN génomique est traité à travers les étapes de préparation de la librairie, qui amplifient spécifiquement les régions génomiques prévues de chaque échantillon en utilisant les oligonucléotides personnalisés conçus par l'utilisateur, tout en ajoutant les index et les séquences de capture des Flow Cell aux produits amplifiés. La préparation de la librairie comporte quatre étapes clés : l'hybridation, l'extension-ligation, l'amplification PCR et la normalisation des librairies. Les librairies d'échantillons normalisées qui en résultent sont prêtes pour le séquençage sur l'instrument MiSeqDx d'Illumina à l'aide de la chimie SBS (séquençage par synthèse). La chimie SBS utilise une méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter les bases à simple nucléotide à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Le logiciel d'analyse en temps réel (RTA) exécute les analyses d'images et la définition des bases tout en affectant un score de qualité à chacune des bases de chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, le logiciel MiSeq Reporter sur l'instrument MiSeqDx traite les définitions des bases par le biais d'une analyse secondaire qui inclut le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF contenant des renseignements sur les variants trouvés à des positions spécifiques dans un génome de référence.

## Limites de la procédure

- 1 Destiné au diagnostic *in vitro*.
- 2 Ce produit présente les limites suivantes :
  - Sortie de séquençage > 1Gb
  - Lectures > 3 millions
  - Longueur de lecture (en analyse à lecture appariée) 2 × 150 pb
  - Bases supérieures à Q30 > 75 % (plus de 75 % des bases ont un score de qualité Phred supérieur à 30, indiquant une exactitude de la définition des bases supérieure à 99,9 %)
- 3 Les variants dans les analyses homopolymères comptant plus de huit bases seront filtrés dans les fichiers VCF (filtre R8).
- 4 Le système a été validé pour la détection des SNV et des suppressions de trois bases maximum. L'évaluation des insertions d'une base a été limitée à trois insertions différentes sur trois chromosomes distincts.
- 5 Le système rencontre des problèmes de détection des insertions ou suppressions d'une base dans les tronçons homopolymères (p. ex. le polyA).
- 6 Le système MiSeqDx est conçu pour offrir des résultats qualitatifs (c.-à-d. de génotype).
- 7 Comme avec n'importe quel flux de travail à base d'hybridation, les polymorphismes, mutations, insertions ou suppressions sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et, par conséquent, les définitions obtenues.

- 8 La couverture minimale recommandée par amplicon nécessaire pour des appels de variants précis ( $Q(\max_{gt} | \text{poly\_site}) \geq 100$ ) est de 75 ×.

## Composants du produit

Le système MiSeqDx d'Illumina comprend les composants suivants :

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

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

Application logicielle	Fonction	Description
MOS : MiSeqDx Operating Software (Logiciel d'exploitation de MiSeqDx)	Commande le fonctionnement de l'instrument.	L'application logicielle MOS gère le fonctionnement de l'instrument au cours du séquençage et génère des images utilisées par le logiciel d'analyse en temps réel (RTA).
RTA : logiciel d'analyse en temps réel	Effectue l'analyse primaire.	L'application logicielle RTA convertit les images générées par MOS pour chaque plaque par cycle de l'analyse de séquençage dans les fichiers de définition des bases qui constituent des entrées pour le logiciel MiSeq Reporter. L'application logicielle RTA ne contient pas d'interface utilisateur.
MiSeq Reporter	Effectue l'analyse secondaire.	Le logiciel MiSeq Reporter traite les définitions de bases par le biais d'une analyse secondaire qui inclut le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF contenant des renseignements sur les variants trouvés à des positions spécifiques dans un génome de référence.

## Stockage et manipulation

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

## Équipement et matériel nécessaires, non fournis

### Consommables pour le séquençage

Trousse universelle MiSeqDx 1.0 (n° de référence DX-103-1001)

### Consommables fournis par l'utilisateur

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

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

## Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

Utilisez toujours de l'eau de laboratoire pour réaliser des procédures sur l'instrument. N'utilisez jamais d'eau courante. Tous les exemples suivants sont acceptables :

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

## Avertissements et précautions



### ATTENTION

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

- 1 **Certains composants des réactifs fournis par Illumina à utiliser avec l'instrument MiSeqDx contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur.** Pour obtenir des renseignements sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). (Consultez les notices propres aux produits pour plus de renseignements.)
- 2 Certains composants des trousse de réactifs fournies par Illumina contiennent du 2-mercaptoéthanol, un agent réducteur. (Consultez les notices propres aux produits pour plus de renseignements.) Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée et mettez au rebut les contenants et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour plus de renseignements, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
- 3 Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.
- 4 Le non-respect des procédures décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
- 5 Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de la trousse.
- 6 Les pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène dans le laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination par des produits PCR peut causer des résultats erronés et non fiables.
- 7 Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de préamplification et de post-amplification aient un équipement réservé (p. ex. pipettes, pointes de pipette, agitateur vortex et centrifugeuse).
- 8 Une paire index-échantillon doit correspondre exactement à la feuille d'échantillons. Les inadéquations entre la feuille d'échantillons et le schéma de la plaque entraîneront une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats erroné.
- 9 Durant l'étape de normalisation de la librairie indiquée dans la notice du réactif en question, il est extrêmement important de resuspendre complètement le culot des billes de la librairie. Cette étape est essentielle pour obtenir une densité uniforme des amplifiats sur la Flow Cell MiSeqDx.
- 10 Suivez les temps d'incubation précisés dans les étapes de normalisation de la librairie comme indiqué dans la notice d'accompagnement du réactif. Une incubation inappropriée peut affecter la représentation de la librairie et la densité des amplifiats.

- 11 Il est vivement recommandé d'installer un logiciel antivirus fourni par l'utilisateur afin de protéger l'ordinateur des virus. Consultez le manuel de l'utilisateur pour obtenir des instructions relatives à l'installation.
- 12 N'utilisez pas l'instrument MiSeqDx si l'un des panneaux a été retiré. L'utilisation de l'instrument lorsque l'un des panneaux a été retiré crée un risque d'exposition à la tension d'alimentation et à plusieurs tensions continues.
- 13 Ne touchez pas la platine de Flow Cell dans le compartiment de Flow Cell. Le réchauffeur dans ce compartiment fonctionne entre 22 °C et 95 °C et peut causer des brûlures.
- 14 L'instrument pèse environ 57 kg (126 lb) et peut causer des blessures graves s'il tombe ou s'il est manipulé sans précaution.

## Notes procédurales

Le débit d'échantillons par analyse MiSeqDx peut être compris entre 8 et 48 échantillons. Les primers d'indexage utilisés pendant l'amplification par PCR doivent être choisis en fonction du débit d'échantillons final souhaité pour assurer la diversité dans la séquence d'indexage.



### REMARQUE

Pour une efficacité maximale du débit, procédez à la préparation de la librairie pour 96 échantillons au plus, puis répartissez les échantillons en deux analyses de séquençage avec un maximum de 48 échantillons par analyse.

L'instrument MiSeqDx utilise un voyant DEL vert pour séquencer des bases G/T et un voyant DEL rouge pour séquencer des bases A/C. À chaque cycle, au moins un des deux nucléotides de chaque canal de couleur doit être lu pour assurer l'enregistrement approprié. Il est important de maintenir l'équilibre des couleurs pour chaque base de la lecture d'index en cours de séquençage, sinon un échec de l'enregistrement pourrait se produire lors du séquençage de la lecture d'index.

Si le séquençage est inférieur à 48 échantillons dans une analyse de séquençage, sélectionnez les index appropriés sur la base de leurs séquences pour maintenir l'équilibre des couleurs dans les canaux verts et rouges. Au minimum, les analyses comportant de 8 à 48 échantillons doivent inclure les combinaisons de primers d'indexage figurant dans la notice d'accompagnement de la trousse universelle MiSeqDx 1.0.

Pour effectuer avec précision des analyses plus petites, il faut au moins huit échantillons. Si six échantillons uniques (à l'exclusion des contrôles positifs et négatifs) ne sont pas disponibles, il convient d'effectuer l'analyse avec les réplicats d'échantillon ou n'importe quel échantillon d'ADN génomique humain. Consultez la notice d'accompagnement de la trousse universelle MiSeqDx 1.0 pour connaître l'ensemble minimal d'indices à équilibre chromatique à utiliser pour les analyses de séquençage de huit échantillons.

## Mode d'emploi

Le mode d'emploi suivant de l'instrument MiSeqDx requiert l'utilisation des réactifs fournis dans la trousse universelle MiSeqDx 1.0.

### Préparation des feuilles d'échantillons MiSeqDx

- 1 À l'écran d'accueil de Illumina Worklist Manager, sélectionnez **Create Worklist** (Créer la liste de travail).
- 2 Dans le champ Test Type (Type de test), sélectionnez **MiSeqDx Universal** (MiSeqDx universel).
- 3 Dans le champ Worklist Name (Nom de la liste de travail), saisissez un nom pour la feuille d'échantillons.
  - Si l'identifiant du code à barres de la cartouche de réactifs alphanumérique est utilisé pour le nom de la feuille d'échantillons, le logiciel MiSeq Operating Software (MOS) trouve automatiquement la feuille d'échantillons.
  - Si un autre nom est utilisé pour la feuille d'échantillons, le bouton **Browse** (Parcourir) du MiSeq Operating Software (MOS) peut être utilisé pour trouver la feuille d'échantillons appropriée.
- 4 **[Facultatif]** Saisissez une description pour identifier l'analyse.
- 5 Assurez-vous que la date correspond à la date de début de l'analyse.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

### Saisie des renseignements sur l'échantillon

- 1 À l'onglet Table (Tableau) ou à l'onglet Plate (Plaque), saisissez les renseignements suivants pour chaque puits contenant un échantillon :
  - a **Sample ID** (Identifiant de l'échantillon) : saisissez un identifiant d'échantillon distinct.
  - b **Index 1 et Index 2** : précisez l'adaptateur d'index qui sera utilisé pour chaque lecture d'index.
  - c **Manifest** (Manifeste) : précisez le nom du fichier de manifeste qui contient les renseignements sur les échantillons dans le puits en question.
- 2 [Facultatif] Pour enregistrer des renseignements plus détaillés sur les échantillons, saisissez un nom et une description.
- 3 [Facultatif] Pour identifier des contrôles sur la plaque, sélectionnez Negative (Négatif) ou Positive (Positif) dans le menu déroulant **Control** (Contrôle).
- 4 Accédez à l'onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque) et utilisez les options **Copy to Clipboard** (Copier dans le bloc-notes) ou **Print** (Imprimer) pour capturer une image de la plaque d'échantillon.
- 5 Sélectionnez **Finish** (Terminer).

### Préparation des échantillons

Suivez les étapes suivantes conformément au mode d'emploi figurant dans la notice d'accompagnement de la trousse universelle MiSeqDx 1.0 :

- Hybridation du pool d'oligonucléotides
- Retrait des oligonucléotides non liés
- Extension-ligation des oligonucléotides liés
- Amplification PCR
- Nettoyage PCR
- Normalisation des librairies
- Regroupement de librairies

### Préparation de la cartouche de réactifs

- 1 Placez la cartouche de réactifs MiSeqDx dans un bain d'eau contenant assez d'eau déionisée à température ambiante pour submerger la base de la cartouche de réactifs jusqu'à la ligne de délimitation de l'eau imprimée sur la cartouche de réactifs. Le niveau de l'eau ne doit pas dépasser la ligne de délimitation maximale.
- 2 Laissez la cartouche décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ une heure ou jusqu'à décongélation complète.
- 3 Retirez la cartouche du bain d'eau et tapotez-la doucement contre la paillasse pour retirer l'eau de la base de la cartouche. Séchez la base de la cartouche. Assurez-vous que l'eau n'a pas éclaboussé la partie supérieure de la cartouche de réactifs.

### Inspection de la cartouche de réactifs

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



#### REMARQUE

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

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



#### REMARQUE

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

- Placez la cartouche de réactifs sur la glace ou réservez-la à une température comprise entre 2°C et 8 °C (pendant un maximum de 6 heures) jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse. Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.

### Préparation des échantillons pour le séquençage

- Prenez un tube **DAL** pour le séquençage.
- Si le tube **DAL** était conservé congelé, décongelez-le complètement et mélangez en pipettant de haut en bas.
- Ajoutez 6 µl de contrôle interne PhiX 20 pM au tube **DAL**.
- Pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et assurer un transfert total.
- Mélangez le tube **DAL** avec un agitateur vortex à vitesse maximale.
- Centrifugez le tube **DAL** à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- Incubez le tube **DAL** sur un bloc chauffant à 96 °C pendant deux minutes.
- Après l'incubation, retournez le tube **DAL** une ou deux fois pour mélanger, puis placez-le immédiatement dans un bain d'eau glacée.
- Gardez le tube **DAL** dans le bain d'eau glacée pendant cinq minutes.



#### REMARQUE

Effectuez l'étape de dénaturation thermique immédiatement avant le chargement du tube **DAL** dans la cartouche de réactifs MiSeqDx pour assurer un chargement efficace du modèle sur la Flow Cell MiSeqDx.

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

- Utilisez une pointe de pipette séparée, propre et vide de 1 ml pour percer l'opercule en aluminium scellant le réservoir sur la cartouche de réactifs étiquetée **Load Samples** (Charger les échantillons).
- À l'aide de la pipette, transférez 600 µl des bibliothèques d'échantillons du tube **DAL** dans le réservoir **Load Samples** (Charger les échantillons). Évitez tout contact avec l'opercule en aluminium.
- Vérifiez s'il y a des bulles d'air dans le réservoir après le chargement de l'échantillon. Si des bulles d'air sont présentes, tapotez légèrement la cartouche sur la paillasse pour les libérer.
- Passez directement à la configuration de l'analyse depuis l'interface du logiciel d'exploitation MiSeq (MOS).

### Configuration de l'analyse

- Ouvrez une session du logiciel d'exploitation de MiSeq (MOS).
- Sélectionnez **Sequence** (Séquencer).  
Une série d'écrans de configuration de l'analyse s'ouvre dans l'ordre suivant : Select Run Type (Sélectionner le type d'analyse), Load Flow Cell (Charger la Flow Cell), Load Reagents (Charger les réactifs), Review (Révision) et Pre-Run Check (Vérification avant analyse).
- Sélectionnez **Diagnostic Run** (Analyse de diagnostic).
- Lorsque l'écran Load Flow Cell (Charger la Flow Cell) s'affiche, nettoyez et chargez la Flow Cell.
- Fermez le verrou de Flow Cell et la porte du compartiment de Flow Cell.  
Le verrou et la porte du compartiment doivent être fermés avant le lancement de l'analyse. Une fois la Flow Cell chargée, le logiciel lit et enregistre l'identification par radiofréquence (RFID). Une confirmation de lecture RFID correcte s'affiche dans le coin inférieur droit de l'écran.
- Lorsque l'écran Load Reagents (Charger les réactifs) s'affiche, videz le flacon à déchets, chargez le flacon de solution SBS (PR2) MiSeqDx, puis chargez la cartouche de réactifs.  
Lorsque le flacon de solution SBS (PR2) MiSeqDX et la cartouche de réactifs sont chargés, le logiciel lit et enregistre la lecture RFID. Une confirmation de lecture RFID correcte s'affiche dans le coin inférieur droit de l'écran.

- 7 Sélectionnez la feuille d'échantillons appropriée.  
Par défaut, le logiciel recherchera un fichier de feuille d'échantillons dont le nom correspond au code à barres de la cartouche de réactifs chargée sur l'instrument.
- 8 Confirmez les paramètres d'analyse et les résultats de la vérification avant analyse.
- 9 Démarrez l'analyse.  
L'écran Sequencing (Séquençage) s'ouvre lorsque l'analyse démarre. Cet écran fournit une représentation visuelle de l'analyse en cours, y compris les intensités et les scores de qualité.

## Résultats

Le logiciel d'analyse primaire intégré (analyse en temps réel ou RTA) exécute les analyses d'images et la définition des bases tout en affectant un score de qualité à chacune des bases de chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, le logiciel MiSeq Reporter sur l'instrument MiSeqDx lance une analyse secondaire, décrite ci-dessous.

### Démultiplexage

Le démultiplexage est la première étape dans l'analyse si la feuille d'échantillons répertorie plusieurs échantillons et que l'analyse comporte des lectures d'index. Le démultiplexage sépare les données des échantillons groupés en fonction de séquences d'indexage courtes qui marquent les échantillons provenant de bibliothèques différentes. Chaque séquence de lecture d'index est comparée aux séquences d'indexage définies dans la feuille d'échantillons. Aucune valeur de qualité n'est prise en compte lors de cette étape.

### Génération de fichiers FASTQ

Après le démultiplexage, MiSeq Reporter génère des fichiers intermédiaires au format FASTQ, qui est un format texte utilisé pour représenter des séquences. Les fichiers FASTQ contiennent les lectures de chaque échantillon ainsi que les scores de qualité, à l'exclusion des lectures provenant de tout amplifiat n'ayant pas passé le filtre. Le score de qualité est calculé de la façon suivante :  $-10 \log_{10} P$ , où  $P$  est la probabilité que la définition des bases soit erronée.

### Alignement

L'alignement compare les séquences par rapport à la référence pour déceler une relation entre les séquences et attribue un score en fonction des régions de similarité. Les lectures alignées sont écrites dans des fichiers au format BAM. Pour la trousse universelle MiSeqDx 1.0, MiSeq Reporter utilise un algorithme de Smith-Waterman par bande, qui effectue des alignements de séquence locaux pour trouver des régions similaires entre deux séquences.

### Appel des variants

Pour la trousse universelle MiSeqDx 1.0, MiSeq Reporter utilise le paramètre d'appel des variants Starling qui appelle les SNP et les petits indels et résume la profondeur et les probabilités pour chaque site du génome. Starling génère des rapports au format html sur les SNP et les indels ainsi que des fichiers de texte séparé par des tabulations contenant des variants au format Variant Call Format (VCF). Pour des renseignements sur le calcul des résultats à partir des fichiers VCF, consultez le *Guide de l'utilisateur de MiSeq Reporter (document n° 15039188)*.

## Caractéristiques de performance

### Précision

Trois études distinctes ont été menées pour évaluer la précision de la plateforme MiSeqDx.

#### Étude 1

Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 24 434 bases sur 19 chromosomes différents et contenant des exons potentiellement pertinents d'un point de vue clinique. Les 13 échantillons uniques utilisés dans cette étude proviennent de deux parents et 11 enfants qui ont été fréquemment séquencés par plusieurs laboratoires et selon plusieurs méthodes de séquençage. Il y a six échantillons de sujets féminins et sept échantillons de sujets masculins. La précision a été déterminée pour les variants mononucléotides (SNV) en comparant les données de l'étude à une base de données de référence bien caractérisée. La séquence de la base de données de référence a été obtenue à partir de la combinaison de plusieurs méthodes de séquençage, de données accessibles au public et de renseignements sur l'hérédité. Le tableau suivant permettant d'évaluer la précision du système a été établi à partir des données de la première analyse au cours de l'étude. Le test n'a pas été répété pour cette étude.

Les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous.



Tableau 1 Données de précision de niveau amplicon de l'étude 1 pour la plateforme MiSeqDx

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
1	1	132	Poly C (5), 63 % en GC	13	15	132	0	132	0	100
2	1	128	Poly T (5)	13	15	128	0	128	0	100
3	2	133	-	13	15	133	0	133	0	100
4	2	119	-	13	15	119	0	119	0	100
5	2	127	Poly T (5)	13	15	127	0	127	0	100
6	2	135	Poly A (6)	13	15	135	0	135	0	100
7	2	122	Poly T (5), Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
8	2	110	Poly T (5)	13	15	110	0	110	0	100
9 <sup>8</sup>	2	131	Poly A (14)	13	15	130-131	0	130-131	9	99,54
10	2	117	-	13	15	117	0	117	0	100
11	2	121	-	13	15	121	0	121	0	100
12	2	114	-	13	15	114	0	114	0	100
13	2	129	Poly A (5)	13	15	129	0	129	0	100
14	3	131	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	131	0	131	0	100
15	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
16	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
18	3	136	Poly T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poly T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poly A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poly A (6), Poly T (5), Région homologue sur un chromosome différent	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Région homologue sur un chromosome différent	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poly T (5)	13	15	129	0	129	0	100
25	4	133	Poly C (7), 66 % en GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poly C (5), 69 % en GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
30	4	121	Poly A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
32	4	134	Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poly A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poly T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
39	4	129	Poly A (5), Poly T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poly T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100
46 <sup>9</sup>	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poly A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poly T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63 % en GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100
68	5	132	Poly A (6), Poly T (8)	13	15	132	0	132	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60 % en GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poly A (5), 59 % en GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poly C (5), 63 % en GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59 % en GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67 % en GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58 % en GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poly G (6), 61 % en GC	13	15	119	0	119	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
85	7	122	Poly T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60 % en GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57 % en GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poly T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Région homologue sur un chromosome différent	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100
93	9	117	Région homologue sur un chromosome différent	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	-	13	15	114	0	114	0	100
95 <sup>10</sup>	9	129	Poly A (14)	13	15	130	0	129 (sur 130)	15	99,23
96	9	114	Région homologue sur un chromosome différent; SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	-	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poly A (5), Poly C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	-	13	15	133	0	133	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
100	9	138	64 % en GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	-	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
103	9	133	Poly A (5), 57 % en GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57 % en GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poly C (5), 67 % en GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70 % en GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62 % en GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60 % en GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58 % en GC; SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57 % en GC	13	15	118	0	118	0	100
111	10	123	Poly T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	-	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26 % en GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	-	13	15	122	0	122	0	100
115	10	124	Poly T (5); Région homologue sur un chromosome différent	13	15	124	0	124	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
116	10	135	CA (4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poly A (6); Région homologue sur un chromosome différent	13	15	135	0	135	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	13	15	119	0	119	0	100
119	10	125	-	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	-	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	-	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	-	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58 % en GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poly T (10)	13	15	117	0	117	0	100
125	11	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poly A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poly T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poly A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poly T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poly T (5)	13	15	132	0	132	0	100



Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19 % en GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
136	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26 % en GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100
142	12	133	Poly A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59 % en GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poly C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
150	13	124	Poly T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26 % en GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poly A (5)	13	15	115	0	115	0	100
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58 % en GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poly C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61 % en GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60 % en GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62 % en GC	13	15	116	0	116	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
168	17	118	Poly C (5); 65 % en GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67 % en GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61 % en GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poly C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61 % en GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58 % en GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poly A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60 % en GC	13	15	114	0	114	0	100
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66 % en GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64 % en GC	13	15	139	0	139	0	100

Amplicon	Chromosome	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'échantillons uniques	Nombre total d'échantillons analysés <sup>2</sup>	Nombre d'appels ayant été effectués par échantillon <sup>3</sup>	Nombre d'absences d'appel <sup>4</sup>	Nombre d'appels exacts par échantillon <sup>5</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>6</sup>	% d'appels exacts <sup>7</sup>
185	19	131	67 % en GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59 % en GC; Région homologue sur un chromosome différent	13	15	141	0	141	0	100
187	19	121	Poly C (5); 72 % en GC; Région homologue sur un chromosome différent	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58 % en GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64 % en GC	13	15	123	0	123	0	100
190	19	138	-	13	15	138	0	138	0	100
191	20	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poly A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62 % en GC; SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66 % en GC	13	15	119	0	119	0	100

<sup>1</sup> « Fragment analysé » signifie la taille de la région génomique séquencée dans les bases, sans prendre en compte les primers spécifiques à la cible.

<sup>2</sup> Le nombre total d'échantillons répertoriés est de 15, car deux des 13 échantillons uniques ont été analysés en deux réplicats indépendants.

<sup>3</sup> Le nombre d'appels obtenus par échantillon correspond au nombre de bases ayant une qualité suffisante pour être définies par le système.

<sup>4</sup> Le nombre d'absences d'appels correspond au nombre de bases dans un amplicon n'entraînant aucune appel dans l'analyse.

<sup>5</sup> Le nombre d'appels exacts par échantillon correspond au nombre de bases dans l'amplicon qui ont été définies et dont les résultats correspondent à la séquence de référence du génome humain version 19 et à la référence composite bien caractérisée.

<sup>6</sup> Le nombre d'appels erronés correspond au nombre total d'appels erronés pour le SNV ou l'indel dans cet amplicon; des précisions supplémentaires sur les appels erronés sont présentées dans les notes de bas de page ci-dessous.

- <sup>7</sup> Le % d'appels exacts correspond au taux de définitions exactes pour toutes les bases dans l'amplicon, où l'appel exact pour le SNV ou l'indel est basée sur les renseignements de la référence composite bien caractérisée et l'appel exact des bases dans le reste de la séquence de l'amplicon est basée sur la comparaison de la séquence de référence du génome humain version 19. Cette colonne peut afficher plus d'un résultat prévu pour un amplicon donné si certains échantillons comprennent un indel et d'autres non, par exemple, l'amplicon 9. Le % d'appels exacts pour les échantillons avec un résultat erroné est présenté dans le tableau.
- <sup>8</sup> L'amplicon 9 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Toutefois, les renseignements de la référence composite bien caractérisée pour sept des 13 échantillons ont 13 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces sept échantillons, cette suppression d'une paire de bases représente un faux négatif dans l'étude de précision de séquençage MiSeqDx.
- <sup>9</sup> L'amplicon 46 a une insertion de bases qui est rapportée dans neuf échantillons dans la base de données de référence bien caractérisée et qui est correctement détectée dans tous les échantillons analysés.
- <sup>10</sup> L'amplicon 95 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Toutefois, les séquences de référence composite bien caractérisée pour 13 des 13 échantillons ont 15 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces 13 échantillons, cette insertion d'une paire de bases représente un faux négatif dans l'étude de précision de séquençage MiSeqDx.

Le tableau suivant contient les données de l'Étude 1 présentées avec la concordance positive et négative en pour cent, où les résultats des variants sont comparés aux renseignements de la référence composite bien caractérisée pour le calcul de la concordance positive en pour cent (CPP). Étant donné que les renseignements de la référence composite fournissent uniquement des résultats pour les variants mononucléotides et les insertions/suppressions, les résultats des bases sans variants sont comparés à la séquence de référence du génome humain version 19 pour le calcul de la concordance négative en pour cent (CNP). Toutes les bases sans variants avaient un taux de concordance de 100 % avec la séquence de référence. Tous les SNV avaient un taux de concordance de 100 % avec la séquence de référence. Les variants qui ont été manqués étaient des insertions d'une base ou des suppressions d'une base dans les régions d'homopolymères.

**Tableau 2** Concordance des résultats des définitions de bases de la plateforme MiSeqDx avec les données de référence pour 13 échantillons bien caractérisés

Échantillon	Nbre d'amplicons	% de couverture d'amplicons <sup>1</sup>	Variants attendus par échantillon <sup>2</sup>	Variants correctement appelés	Variants manqués <sup>3</sup>	Bases sans variants appelées correctement	CPP <sup>4</sup> (%)	CNP <sup>5</sup> (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24 418	89,47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24 417	89,47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24 416	95,00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24 417	90,00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24 415	90,91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24 419	93,75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24 412	95,83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24 415	95,24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24 417	89,47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24 415	90,91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24 416	94,74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24 412	95,83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24 417	90,00	100

<sup>1</sup> Le pourcentage de couverture d'amplicons est le nombre de bases dans les amplicons séquencées avec fiabilité.

<sup>2</sup> Les variants prévus par échantillon comprennent les SNV et les indels.

<sup>3</sup> Pour les variants manqués, veuillez consulter le premier tableau de l'étude 1 et les notes de bas de page 8 à 10.

<sup>4</sup> Concordance positive en pour cent (CPP) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ , où les vrais positifs (TP) sont le nombre d'appels de variants positifs aux coordonnées génomiques où sont présents les variants selon la séquence de référence et l'allèle mutant défini est concordant avec la séquence de référence (colonne nommée « Variants correctement appelés ») et les faux négatifs (FN) sont le nombre d'appels de variants négatifs aux coordonnées génomiques où sont présents les variants selon la séquence de référence (colonne nommée « Variants manqués »).

<sup>5</sup> Concordance négative en pour cent (CNP) =  $100 \times TN / (FP + TN)$  où les faux positifs (FP) sont le nombre d'appels de variants positifs aux coordonnées génomiques où sont absents les variants selon la séquence de référence, ou si l'allèle mutant appelé est discordant avec la séquence de référence (non référencé dans le tableau; aucune appel de variants faux positifs n'a été effectué dans cette étude) et les vrais négatifs (TN) sont le nombre d'appels de variants négatifs aux coordonnées génomiques où sont absents les variants selon la séquence de référence (colonne nommée « Bases sans variants appelées correctement »).

## Étude 2

Les résultats de séquençage pour le panel d'amplicons ci-dessus ont été comparés à un génotype d'une grande fiabilité établi pour NA12878 par le National Institutes of Standards and Technology (NIST, Institut national des normes et de la technologie) (v.2.15<sup>1</sup>). Sur les 195 amplicons, 184 amplicons étaient compris dans les appels de référence d'une grande fiabilité dans la séquence du NIST et ont été comparés. Les définitions des bases sans variants ont été comparées à la séquence du génome humain de référence version 19.

**Tableau 3** Comparaison des résultats de séquençage de la plateforme MiSeqDx pour l'échantillon NA12878 avec la base de données du NIST

Échantillon	Nbre d'amplicons	% de couverture d'amplicons <sup>2</sup>	Variants attendus	Variants correctement appelés	Variants manqués	Bases sans variants appelées correctement	CPP <sup>3</sup> (%)	CNP <sup>4</sup> (%)
NA12878	184	100	17	16	1 <sup>5</sup>	23 066	94,12	100

<sup>1</sup> Zook, JM et al. Integrating sequencing datasets to form highly confident SNP and indel genotype calls for a whole human genome. arXiv:1307.4661 [q-bio.GN].

<sup>2</sup> Le pourcentage de couverture d'amplicons est le nombre de bases dans les amplicons séquencées avec fiabilité.

<sup>3</sup> Concordance positive en pour cent (CPP) =  $100 \times TP / (TP + FN)$ .

<sup>4</sup> Concordance négative en pour cent (CNP) =  $100 \times TN / (FP + TN)$ .

<sup>5</sup> Le variant manqué est la suppression d'une paire de bases dans l'amplicon 9 d'une analyse homopolymère de 14 A non appelés par le système MiSeqDx présente dans la séquence NIST. Notez que la séquence NIST n'inclut pas l'insertion d'une paire de bases dans l'autre homopolymère de A qui était présent dans l'autre base de données de référence utilisée ci-dessus dans l'étude 1.

## Étude 3

Une étude de précision supplémentaire a été réalisée pour évaluer les performances des petites insertions et suppressions dans le cadre d'un test représentatif, le test de la fibrose kystique à 139 variants MiSeqDx d'Illumina, qui comprenait un sous-ensemble de variations génétiques *CFTR* significatives sur le plan clinique et analysées avec le logiciel MiSeq Reporter en utilisant le flux de travail ciblé de séquençage de l'ADN associé à la plateforme MiSeqDx. Les insertions et suppressions demandées ont été détectées à l'emplacement prévu avec une fiabilité élevée. Ces échantillons ont été caractérisés grâce au séquençage bidirectionnel Sanger utilisé comme méthode de référence pour établir la séquence prévue.

**Tableau 4** Résumé de la détection des indels à l'aide de la plateforme MiSeqDx

Amplicon	Taille des inserts	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'appels obtenus par échantillon	Nombre de bases appelées par échantillon	Nombre d'absences d'appels	Nombre d'appels exacts par échantillon	Nombre d'appels erronés	% d'appels exacts
1	129	Insertion d'une base	130	130	0	130	0	100
2	154	Suppression de trois bases	151	151	0	151	0	100
3	167	Suppression de deux bases	165	165	0	165	0	100
4	134	Suppression d'une base	133	133	0	133	0	100

Amplicon	Taille des inserts	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'appels obtenus par échantillon	Nombre de bases appelées par échantillon	Nombre d'absences d'appels	Nombre d'appels exacts par échantillon	Nombre d'appels erronés	% d'appels exacts
5	132	Suppression d'une base	131	131	0	131	0	100
6	129	Suppression d'une base	128	128	0	128	0	100

Les données qui ressortent de ces études de précision confirment que la plateforme MiSeqDx peut séquencer avec précision les éléments suivants :

- Teneur en GC  $\geq 19$  % (toutes les bases dans 135 des 135 amplicons séquencés ayant un taux de 19 % de teneur en GC ont été appelées correctement)
- Teneur en GC  $\leq 72$  % (toutes les bases dans 135 des 135 amplicons séquencés ayant un taux de 72 % de teneur en GC ont été appelées correctement)
- Longueurs de PolyA  $\leq 7$  (la répétition PolyA de sept nucléotides a été appelée correctement dans 270 des 270 amplicons séquencés contenant PolyA = 7)
- Longueurs de PolyT  $\leq 8$  (la répétition PolyT de huit nucléotides a été appelée correctement dans 270 des 270 amplicons séquencés contenant PolyT = 8)
- Longueurs de PolyG  $\leq 6$  (la répétition PolyG de six nucléotides a été appelée correctement dans 405 des 405 amplicons séquencés contenant PolyG = 6)
- Longueurs de PolyC  $\leq 7$  (la répétition PolyC de sept nucléotides a été appelée correctement dans 135 des 135 amplicons séquencés contenant PolyC = 7)
- Longueurs de répétition de dinucléotides  $\leq 5 \times$  (toutes les bases dans 135 des 135 amplicons séquencés avec une répétition de dinucléotides de  $5 \times$  ont été appelées correctement)
- Longueurs de répétition de trinucléotides  $\leq 4 \times$  (toutes les bases dans 810 des 810 amplicons séquencés avec une répétition de trinucléotides de  $4 \times$  ont été appelées correctement)
- Insertions d'une base et suppressions de trois bases ou moins
  - Deux des trois insertions d'une base testées ont été appelées correctement. Des appels exacts ont été effectués pour deux insertions d'une base dans des régions non homopolymères dans 82 amplicons. Une insertion d'une base n'a pas été appelée dans une analyse d'homopolymères de 14 A sur le chromosome 2 dans 135 amplicons.
  - Trois des quatre suppressions d'une base ont été appelées correctement. Tous les appels exacts ont été effectués dans des régions non homopolymères dans quatre amplicons. Une suppression d'une base n'a pas été appelée dans une analyse d'homopolymères de 14 A sur le chromosome 9 dans 63 amplicons.
  - La suppression de deux bases a été appelée correctement dans un échantillon.
  - Les suppressions de trois bases ont été appelées correctement dans 21 échantillons.



## Reproductibilité

La reproductibilité de la plateforme MiSeqDx a été déterminée à l'aide de deux tests représentatifs.

### Étude 1

Un test représentatif a été conçu pour étudier divers gènes couvrant 24 434 bases sur 19 chromosomes différents et contenant des exons potentiellement pertinents sur le plan clinique. L'étude a permis d'examiner 13 échantillons au cours de neuf analyses à l'aide de trois instruments MiSeqDx différents avec le concours de trois opérateurs distincts ([Tableau 5](#)). Un lot unique de réactifs de préparation de la librairie et deux lots de consommables pour le séquençage ont été utilisés. Les 13 échantillons provenaient de deux parents et 11 enfants qui avaient été fréquemment séquencés par plusieurs laboratoires et selon plusieurs méthodes de séquençage. Deux échantillons ont été analysés en double exemplaire, donc chaque analyse a généré des résultats pour 15 échantillons.

Pour l'évaluation de la reproductibilité entre lots, 94 échantillons et deux contrôles sans modèle ont été testés dans l'ensemble des trois lots. Chaque lot a été scindé en deux analyses de 48 échantillons pour tester tous les réactifs et les combinaisons de primers d'index possibles. Toutes les analyses de séquençage ont été réalisées par un seul opérateur sur un seul instrument MiSeqDx pour éviter toute variation éventuelle due à l'opérateur ou à l'instrument ([Tableau 6](#)).

Des appels exacts ont été déterminés pour les variants mononucléotides (SNV) en comparant les données de l'étude à des renseignements de la référence bien caractérisée. Il n'y a eu aucun échec d'analyse ni répétition d'analyse pour l'étude de reproductibilité. Les tableaux suivants contiennent les résultats des études destinées à évaluer la reproductibilité du système.

Tableau 5 Résultats de la reproductibilité d'instrument à instrument de l'étude 1 pour la plateforme MiSeqDx (au niveau de l'amplicon)

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
1	1	132	Poly C (5); 63 % en GC	135	0	0	100	23 <sup>6</sup>	0	99,61 <sup>7</sup>	39 <sup>6</sup>	0	99,34 <sup>7</sup>
2	1	128	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poly T (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poly A (14)	135	0	27 <sup>8</sup>	99,54	0	27 <sup>8</sup>	99,54	0	27 <sup>8</sup>	99,54
10	2	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
12	2	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
14	3	131	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
21	3	117	Poly A (6); Poly T (5); Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
23	3	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poly C (7); 66 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poly C (5); 69 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
27	4	123	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poly A (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
37	4	128	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
39	4	129	Poly A (5); Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
51	4	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
53	4	126	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
59	5	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
60	5	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
64	5	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
66	5	131	63 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
67	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poly A (6); Poly T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
69	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poly A (5); 59 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poly C (5); 63 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
75	7	127	59 % en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
78	7	133	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poly G (6); 61 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
91	9	119	Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
93	9	117	Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poly A (14)	135	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22	0	45 <sup>9</sup>	99,22
96	9	114	Région homologue sur un chromosome différent; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100



Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
103	9	133	Poly A (5); 57 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
105	9	136	Poly C (5); 67 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58 % en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
115	10	124	Poly T (5); Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA (4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poly A (6); Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poly T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
125	11	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
130	11	127	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
139	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
142	12	133	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
144	12	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
158	14	122	58 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60 % en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poly C (5); 65 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67 % en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
174	17	131	58 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59 % en GC; Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicon	Chr.	Taille du fragment analysé <sup>1</sup>	Contenu génomique de l'amplicon	Nombre d'analyses d'échantillons <sup>2</sup>	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>	Nombre total d'absences d'appels <sup>3</sup>	Nombre d'appels erronés <sup>4</sup>	% d'appels exacts <sup>5</sup>
187	19	121	Poly C (5); 72 % en GC; Région homologue sur un chromosome différent	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
189	19	123	64 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
192	22	136	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62 % en GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66 % en GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

<sup>1</sup> « Fragment analysé » signifie la taille de la région génomique séquencée dans les bases, sans prendre en compte les primers spécifiques à la cible.

<sup>2</sup> Le nombre d'échantillons est calculé à partir de neuf analyses de 15 échantillons (11 échantillons analysés une fois et deux échantillons analysés deux fois).

<sup>3</sup> Le nombre total d'absences d'appels correspond au nombre total d'absences d'appels obtenus pour l'ensemble des 45 analyses de l'amplicon en question à l'aide d'un instrument MiSeqDx spécifié.

<sup>4</sup> Le nombre total d'appels erronés correspond au nombre total d'appels erronés pour l'ensemble des 45 analyses de l'amplicon en question à l'aide d'un instrument MiSeqDx spécifié.

<sup>5</sup> Le % d'appels exacts correspond au débit des appels exacts pour toutes les bases dans l'amplicon, où l'appel exact pour le SNV ou l'indel est basé sur la base de données de référence bien caractérisée et l'appel exact pour les bases dans le reste de la séquence d'amplicon est basé sur la comparaison de la séquence de référence du génome humain version 19. Cette colonne peut afficher plus d'un résultat prévu pour un amplicon donné si certains échantillons doivent avoir un indel et d'autres non, par exemple, l'amplicon 9.

- <sup>6</sup> L'amplicon 1 possédait un certain nombre de bases dont le génotype ne pouvait pas être appelé : 12 bases dans une analyse sur neuf dans NA12881; une base dans deux analyses sur neuf et trois bases dans une analyse sur neuf dans NA12886; 20 bases dans une analyse sur neuf et 26 bases dans une analyse sur neuf dans NA12888. Cela est dû à la faible couverture dans les bases sans aucun appel dans ces analyses, où la profondeur moyenne de séquençage était de 33,2, avec un minimum de 21 et un maximum de 52.
- <sup>7</sup> Lorsque le nombre d'absence d'appels n'est pas inclus dans le calcul, le taux d'appels exacts est de 100 %.
- <sup>8</sup> L'amplicon 9 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Toutefois, les renseignements de la référence bien caractérisée pour sept des 13 échantillons ont 13 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces sept échantillons, cette suppression d'une paire de bases s'appelle un faux négatif et est appelée comme faux négatif de façon reproductible dans les neuf analyses.
- <sup>9</sup> L'amplicon 95 a une analyse d'homopolymères de 14 A selon la séquence de référence du génome humain version 19. Cependant, les séquences de renseignements de la référence bien caractérisée pour 13 des 13 échantillons ont 15 A dans cette analyse d'homopolymères. Dans ces 13 échantillons, cette insertion d'une paire de bases n'est pas appelée de façon reproductible à 100 % (c.-à-d. qu'il s'agit d'un faux négatif).



Les résultats de l'étude 1 de reproductibilité pour chaque échantillon sont présentés pour l'ensemble des neuf analyses en une seule colonne. Les résultats affichés portent uniquement sur les variants à simple nucléotide et les résultats des insertions/suppressions par rapport à la séquence de la base de données de référence pour les trois analyses réalisées sur trois instruments. Cette analyse a montré que les résultats des variants étaient reproductibles dans neuf analyses pour ces échantillons.

**Tableau 6** Résumé des résultats de reproductibilité de la plateforme MiSeqDx pour 13 échantillons bien caractérisés

N° d'ADN	Identifiant de l'échantillon d'ADN	Nombre d'analyses par échantillon	Nombre de SNV	Variants mononucléotides (SNV)			Nombre d'indels	Insertions/suppressions (indels)		
				Nombre de bases appelées correctement	Nombre de faux positifs <sup>1</sup>	Nombre de faux négatifs <sup>2</sup>		Nombre de bases appelées correctement	Nombre de faux positifs <sup>1</sup>	Nombre de faux négatifs <sup>2</sup>
1	NA12877 <sup>3</sup>	18	16	16	0	0	3	1	0	2
2	NA12878 <sup>3</sup>	18	17	17	0	0	2	0	0	2
3	NA12879	9	18	18	0	0	2	1	0	1
4	NA12880	9	17	17	0	0	3	1	0	2
5	NA12881	9	19	19	0	0	3	1	0	2
6	NA12882	9	15	15	0	0	1	0	0	1
7	NA12883	9	22	22	0	0	2	1	0	1
8	NA12884	9	19	19	0	0	2	1	0	1
9	NA12885	9	17	17	0	0	2	0	0	2
10	NA12886	9	19	19	0	0	3	1	0	2
11	NA12887	9	18	18	0	0	1	0	0	1
12	NA12888	9	22	22	0	0	2	1	0	1
13	NA12893	9	17	17	0	0	3	1	0	2

<sup>1</sup> Faux positif = variant appelé par l'analyse de séquençage MiSeqDx, mais ne figurant pas dans la base de données de référence.

<sup>2</sup> Faux négatif = variant figurant dans la base de données de référence, mais non appelés dans l'analyse de séquençage MiSeqDx.

<sup>3</sup> Les échantillons NA12877 et NA12878 ont été analysés deux fois. Les échantillons répliqués ont généré des résultats identiques.

## Étude 2

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

Tableau 7 Résumé des résultats de l'étude de reproductibilité réalisée avec un test représentatif de la fibrose kystique à 139 variants MiSeqDx

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

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels erronés	Nombre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A > G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849 + 10kbC > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621 + 1G > T/3120 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C absents	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621 + 1G > T/711 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

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

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels erronés	Nombre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
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
B	50	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s.o.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

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

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels erronés	Nombre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	72 <sup>4</sup>	621 + 1G > T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621 + 1G > T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G > A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s.o.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789 + 5G > A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nombre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nombre d'appels erronés	Nombre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	s.o.	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74 556	2 209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

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

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

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

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



## Extraction d'ADN

Trois différentes méthodes d'extraction, à savoir l'extraction à base de billes magnétiques, la précipitation dans l'alcool et la filtration sur colonne de silice, ont été évaluées à l'aide de sang total K<sub>2</sub>EDTA anticoagulé. Quatorze échantillons de sang unique ont été utilisés dans l'étude, représentant une plage de génotypes d'un seul gène représentatif. Les trois méthodes d'extraction de l'ADN ont été testées indépendamment par deux opérateurs différents qui ont chacun effectué trois analyses par la méthode d'extraction. Chaque extraction a été réalisée par chaque opérateur à des jours différents. La concentration d'ADN et le rapport A260/A280 des échantillons d'ADNg extrait ont été déterminés par spectrophotométrie. La taille totale des échantillons pour chaque méthode d'extraction dans cette étude était de 168 (14 échantillons × 2 opérateurs/méthode d'extraction × 3 analyses/opérateur × 2 réplicats/échantillon d'ADNg extrait).

Méthode d'extraction	Nombre d'échantillons testés	Débit de génotypage	Précision <sup>1</sup>	Débit au premier passage de l'échantillon <sup>2</sup>
Précipitation dans l'alcool	168	100 %	100 %	100 %
Filtration sur colonne de silice	168	100 %	100 %	100 %
Extraction à base de billes magnétiques	168	100 %	100 %	100 %

<sup>1</sup> Précision : la concordance en pour cent avec une méthode d'essai de référence (séquençage bidirectionnel de Sanger) calculée pour les positions de base qui reçoivent une définition des bases.

<sup>2</sup> Débit au premier passage de l'échantillon : le nombre d'échantillons respectant le débit de génotypage spécifié la première fois qu'ils sont traités (c'est-à-dire, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une nouvelle analyse ou un traitement supplémentaire) en pourcentage du nombre total d'analyses d'échantillons au cours d'une seule expérience de séquençage MiSeqDx.

## Entrée d'ADN

La plage d'entrée d'ADN pour la plateforme MiSeqDx a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série à l'aide de 14 échantillons d'ADN représentatifs contenant 16 variants du gène unique. Chaque échantillon a été testé en double exemplaire sur neuf niveaux d'entrée d'ADN allant de 1 250 ng à 1 ng (1 250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng et 1 ng). Pour la détermination de la précision, des génotypes de l'échantillon ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel par la méthode de Sanger. Les limites supérieure et inférieure identifiées pour une entrée d'ADN sont respectivement de 1 250 ng et 25 ng, car elles présentaient un débit au premier passage ≥ 95 % sans aucun appel incorrect (précision et débit d'appel de 100 %).

Les entrées d'ADN de 1 250 ng, 250 ng et 100 ng ont fait l'objet d'autres tests avec quatre échantillons d'ADN représentatifs et 20 réplicats par niveau d'entrée d'ADN pour chaque échantillon (n = 4 × 20 = 80 échantillons), tandis que la limite inférieure de 25 ng a été testée avec 14 échantillons, 20 réplicats pour chaque échantillon (n = 14 × 20 = 280 échantillons). Le débit au premier passage de l'échantillon et le taux de précision était de 100 % à tous les niveaux d'entrée d'ADN et les taux d'appel de l'échantillon étaient > 99 %.

## Substances interférentes

Pour évaluer l'incidence des substances interférentes sur la plateforme MiSeqDx, un test représentatif conçu pour étudier un seul gène couvrant 11 529 bases a été évalué en présence et en l'absence d'interférences potentielles. Huit échantillons de sang total représentant huit génotypes uniques ont été utilisés dans l'étude. Quatre substances interférentes endogènes (bilirubine, cholestérol, hémoglobine et triglycérides) ont été testées en les intégrant dans les échantillons de sang total avant l'extraction d'ADN. Pour évaluer l'interférence résultant du prélèvement sanguin (petit volume), de l'EDTA a été intégré dans des échantillons de sang à deux concentrations. Les limites de concentration pour chaque substance sont indiquées dans le tableau ci-dessous. En outre, afin d'évaluer les interférences résultant de la préparation des échantillons, on a ajouté 15 % de tampon de lavage à huit ADN génomiques purifiés.

Un débit d'appel de 100 % a été atteint pour tous les échantillons testés en plus des 100 % de reproductibilité dans les typages génotypiques entre les échantillons en présence et en l'absence de substances interférentes.

Substance de test	Nombre total de répliquats	Concentration analysée dans le sang (limite supérieure)	Concentration analysée dans le sang (limite inférieure)	Débit d'appel
Bilirubine	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Cholestérol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hémoglobine	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglycéride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

## Indexage de l'échantillon

Des primers d'indexage de l'échantillon sont utilisés dans la trousse pour attribuer un code à barres unique à chaque échantillon d'ADN, permettant de grouper plusieurs échantillons en une seule analyse de séquençage.

Un total de 96 index d'échantillons a été analysé à l'aide d'un test représentatif conçu pour étudier un seul gène couvrant 11 529 bases grâce à huit échantillons d'ADN unique pour vérifier la capacité du test à faire systématiquement un appel de génotypage pour un échantillon donné à travers des combinaisons différentes de primers d'indexage. Chaque échantillon a été analysé avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexage. Quarante-huit (48) combinaisons d'index ont été testées en une seule analyse de séquençage. Les résultats des échantillons ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel de Sanger pour l'ensemble des positions/variants. La reproductibilité et la précision ont été de 100 % pour toutes les combinaisons de primers d'indexage/échantillon.

## Brevets et marques de commerce

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

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

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

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

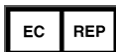
© 2017 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

## Coordonnées



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, 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](http://www.illumina.com)



Illumina Cambridge Limited  
Chesterford Research Park,  
Little Chesterford  
Saffron Walden, CB10 1XL  
ROYAUME-UNI



Commanditaire australien :  
Illumina Australia  
1 International Court  
Scoresby, Victoria, 3179  
Australie

## Étiquette du produit

La liste complète des symboles qui peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage du produit peut être téléchargée du site Web en format PDF. Rendez-vous sur [support.illumina.com](http://support.illumina.com), sélectionnez un produit, puis cliquez sur Documents & Literature (Documentation).