

Instrument NextSeq^{MC} 550Dx

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT

N° de référence 20005715

Utilisation prévue

L'instrument NextSeq 550Dx est destiné au séquençage de bibliothèques d'ADN avec les tests de diagnostic *in vitro*. L'instrument NextSeq 550Dx doit être utilisé avec des réactifs de diagnostic *in vitro* enregistrés, certifiés ou approuvés, ainsi qu'avec un logiciel d'analyse.

Principes procéduraux

L'instrument NextSeq 550Dx d'Illumina est destiné au séquençage de bibliothèques d'ADN avec *les tests de diagnostic in vitro*. Au départ, l'instrument NextSeq 550Dx utilise des bibliothèques préparées à partir d'ADN pour lesquelles des index d'échantillons et des séquences de saisie sont ajoutés à des cibles amplifiées. Les bibliothèques d'échantillons sont capturées sur la Flow Cell puis séquencées sur l'instrument à l'aide de la chimie de séquençage par synthèse (SBS). La chimie SBS utilise une méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter les bases à simple nucléotide à marqueur fluorescent, à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Le logiciel Real-Time Analysis (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, une analyse secondaire peut être faite sur l'instrument pour le traitement des définitions des bases. L'instrument NextSeq 550Dx utilise différents modules pour l'analyse secondaire en fonction du flux de travail. Dans le cas des modules d'analyse des variants germinaux et somatiques, le traitement comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF (VCF et gVCF). Les fichiers VCF et gVCF contiennent des renseignements sur les variants à des positions spécifiques dans le génome de référence.

Configuration à amorçage double

L'instrument NextSeq 550Dx comprend la configuration à amorçage double, qui permet l'utilisation de l'instrument en mode diagnostic ou en mode recherche uniquement. Les tests de séquençage diagnostique *in vitro*, y compris les modules des variants germinaux et somatiques, sont exécutés en mode diagnostic. Seuls les réactifs de séquençage DIV peuvent être utilisés en mode diagnostic. Les caractéristiques de performance et les limites de la procédure de l'instrument NextSeq 550Dx ont été établies au moyen des modules des variants germinaux et somatiques en mode diagnostic.

Limites de la procédure

- 1 Destiné au diagnostic *in vitro*.
- 2 Les modules d'analyse des variants germinaux et somatiques, lorsqu'ils sont utilisés avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) ou la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), peuvent fournir ce qui suit :
 - ▶ sortie de séquençage ≥ 90 gigabases (Gb);
 - ▶ longueur de lecture (en analyse à lecture appariée) de 2 × 150 paires de base (pb);
 - ▶ bases égales ou supérieures à Q30 ≥ 75 % à une longueur de lecture de 2 x 150 bp (au moins 75 % des bases ont un score de qualité Phred supérieur ou égal à 30, ce qui indique une exactitude de la définition des bases supérieure à 99,9 %).

- 3 Les lectures comportant des indels (insertions, délétions ou combinaisons) dont la longueur du contenu est supérieure à 25 pb ne sont pas alignées par le logiciel de test. Par conséquent, les indels de plus de 25 pb ne sont pas détectables par le logiciel de test.
- 4 Il se peut que les lectures d'amplicons affichant un contenu de variants extrême ne soient pas alignées par le logiciel de test, et que la région soit ainsi signalée comme étant de type sauvage. Les contenus extrêmes comprennent :
 - ▶ les lectures comportant plus de trois indels;
 - ▶ les lectures d'une longueur d'au moins 30 pb dont le contenu de variants mononucléotides (SNV) est supérieur à 4 % de la longueur totale d'amplicon cible (excluant les régions sondées);
 - ▶ les lectures d'une longueur inférieure à 30 pb dont le contenu de SNV est supérieur à 10 % de la longueur totale d'amplicon (y compris les régions sondées).
- 5 Les variants importants, y compris les variants à multiples nucléotides (MNV) et les indels importants, peuvent être désignés comme plusieurs variants distincts de plus petite taille dans le fichier VCF de sortie.
- 6 Les variants de délétion peuvent être filtrés ou omis lorsqu'ils s'étendent sur deux amplicons qui se chevauchent, si la longueur de la délétion est supérieure ou égale au chevauchement entre les amplicons.
- 7 Le système ne peut détecter les indels s'ils sont directement adjacents à un primer et qu'il n'y a pas d'amplicons se chevauchant. Pour les régions contenant des amplicons de chevauchement, le test ne peut pas détecter des délétions lorsque la zone de chevauchement est plus petite que la délétion à détecter. Par exemple, si la région de chevauchement entre deux amplicons adjacents est de deux bases, le test ne détectera aucune délétion, pas même ces deux bases. Une délétion de base unique au niveau de l'une ou l'autre de ces bases peut être détectée.
- 8 Comme avec n'importe quel flux de travail de préparation de librairie de type hybridation, les polymorphismes, mutations, insertions ou délétions sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et les définitions obtenues durant le séquençage. Par exemple :
 - ▶ Un variant en phase avec un variant dans la région du primer peut ne pas être amplifié, ce qui entraîne un faux négatif.
 - ▶ Les variants dans la région du primer pourraient empêcher l'amplification de l'allèle de référence et entraîner un appel de variant homozygote erroné.
 - ▶ Les variants d'indels dans la région du primer peuvent entraîner un faux positif à la fin de la lecture adjacente au primer.
- 9 Les indels peuvent être filtrés en raison du biais de brin, s'ils se trouvent près de la fin d'une lecture et sont écrêtés doucement durant l'alignement.
- 10 Les petits MNV n'ont pas été validés et ne sont signalés que dans le module d'analyse des variants somatiques.
- 11 Les délétions sont signalées dans les fichiers VCF aux coordonnées de la base précédente, selon le format VCF. Par conséquent, il faut tenir compte des variants adjacents avant de déclarer qu'une définition de base est une référence homozygote.
- 12 Limites spécifiques au flux de travail germinale :
 - ▶ L'instrument NextSeq 550Dx, lorsqu'il est utilisé avec le module d'analyse des variants germinaux de Local Run Manager pour NextSeq 550Dx, est conçu pour produire des résultats qualitatifs aux fins de l'appel des variants germinaux (p. ex., homozygote, hétérozygote, type sauvage).
 - ▶ Lorsque le module d'analyse des variants germinaux est utilisé, la couverture minimale par amplicon requise pour obtenir un appel de variants précis est de 150x. Par conséquent, il faut 150 fragments d'ADN pris en charge, ce qui équivaut à 300 lectures appariées se chevauchant. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées ont une incidence sur la couverture. Le contenu génomique, notamment la teneur en GC, peut avoir une incidence sur la couverture.
 - ▶ La variation du nombre de copies peut déterminer si un variant est identifié comme étant homozygote ou hétérozygote.

- ▶ Dans certains contextes répétitifs, les variants sont filtrés dans les fichiers VCF. Le filtre de répétitions RMxN sert à filtrer les variants lorsque la séquence du variant se retrouve, en totalité ou en partie, à répétition dans le génome de référence adjacent à la position du variant. En ce qui concerne l'appel des variants germinaux, il faut qu'il y ait au moins neuf répétitions dans la référence pour qu'un variant soit filtré. Seules les répétitions d'une longueur d'au plus 5 pb seront prises en compte (R5x9).
 - ▶ Si un indel et un SNV sont présents pour un même locus, il se peut qu'un seul variant soit détecté.
- 13 Limites spécifiques au flux de travail somatique.
- ▶ L'instrument NextSeq 550Dx, lorsqu'il est utilisé avec le module d'analyse des variants somatiques de Local Run Manager pour NextSeq 550Dx, est conçu pour produire des résultats qualitatifs aux fins de l'appel des variants somatiques (c.-à-d. présence d'un variant somatique dont la fréquence de variant est supérieure ou égale à 0,026, avec une limite de détection de 0,05).
 - ▶ Lorsque le module d'analyse des variants somatiques est utilisé, la couverture minimale par amplicon requise pour obtenir un appel de variants précis est de 450x par pool d'oligonucléotides. Par conséquent, il faut 450 fragments d'ADN pris en charge par pool d'oligonucléotides, ce qui équivaut à 900 lectures appariées se chevauchant. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées ont une incidence sur la couverture. Le contenu génomique, notamment la teneur en GC, peut avoir une incidence sur la couverture.
 - ▶ En ce qui concerne l'appel des variants somatiques, il faut qu'il y ait au moins six répétitions dans le génome de référence pour qu'un variant soit filtré, et seules les répétitions d'une longueur d'au plus 3 pb seront prises en compte (R3x6).
 - ▶ Le module d'analyse des variants somatiques ne peut distinguer les variants germinaux des variants somatiques. Le module est conçu pour détecter les variants dans une fourchette de fréquences de variant, mais elle ne peut servir à différencier les variants somatiques et germinaux.
 - ▶ Le tissu normal dans l'échantillon a une incidence sur la détection des variants. La limite de détection indiquée est fondée sur une fréquence de variant relative à l'ADN total extrait des tissus tumoraux et normaux.

Composants du produit

- 1 L'instrument NextSeq 550Dx (n° de référence 20005715)
- 2 Les composants logiciels pour l'instrument NextSeq 550Dx, notamment ce qui suit :

Application logicielle	Fonction	Description
Logiciel d'exploitation NextSeq 550Dx (NOS)	Commande le fonctionnement de l'instrument.	L'application logicielle NOS gère le fonctionnement de l'instrument au cours du séquençage et génère des images utilisées par le logiciel Real-Time Analysis (RTA).
Logiciel Real-time Analysis (RTA)	Effectue l'analyse primaire.	L'application logicielle RTA convertit les images générées par NOS pour chaque plaque par cycle de l'analyse de séquençage dans les fichiers de définition des bases qui constituent des entrées pour les modules d'analyse dans Local Run Manager. L'application logicielle RTA ne contient pas d'interface utilisateur.
Local Run Manager	Interface pour la sélection du module.	Le logiciel Local Run Manager est une solution intégrée sur instrument, destinée à la gestion des utilisateurs, à la sélection du module d'analyse approprié et à la surveillance de l'état de progression.
Module d'analyse des variants somatiques	Effectue l'analyse secondaire.	Ce module d'analyse de Local Run Manager traite les définitions des bases par le biais d'analyses secondaires. Le processus comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la création de rapports. L'appel des variants (Pisces) génère des fichiers VCF qui contiennent des renseignements sur les variants que l'on trouve à des positions spécifiques dans un génome de référence et comprend la fréquence de variant mesurée.

Application logicielle	Fonction	Description
Module d'analyse des variants germinaux	Effectue l'analyse secondaire.	Ce module d'analyse de Local Run Manager traite les définitions des bases par le biais d'analyses secondaires. Le processus comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la création de rapports. L'appel des variants (Pisces) génère des fichiers VCF qui contiennent des renseignements sur les variants que l'on trouve à des positions spécifiques dans un génome de référence et détermine si un variant est identifié comme étant hétérozygote ou homozygote.

Conditions d'utilisation

Élément	Spécification
Température	Maintenez la température du laboratoire entre 19 °C et 25 °C (22 °C ± 3 °C), soit la température de fonctionnement de l'instrument. Au cours d'une analyse, empêchez toute variation de la température ambiante de plus de ± 2 °C.
Humidité	Maintenez une humidité relative sans condensation comprise entre 20 et 80 %.

Équipement et matériel

Équipement et matériel requis, vendus séparément

Trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles), n° de référence 20019554

Trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), n° de référence 20028871

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Consommables fournis par l'utilisateur pour les analyses de séquençage

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714 (ou équivalent) Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage de la Flow Cell et usage général
Tissu de laboratoire peu pelucheux	VWR, n° de référence 21905-026 (ou équivalent)	Nettoyage de la Flow Cell et usage général

Consommables fournis par l'utilisateur pour la maintenance de l'instrument

Consommable	Fournisseur	Utilisation
NaOCl, 5 % (hypochlorite de sodium)	Sigma-Aldrich, n° de référence 239305 (ou produit de catégorie laboratoire équivalent)	Lavage de l'instrument à l'aide de la fonction de lavage manuel après analyse; dilution à 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, n° de référence P7949	Lavage de l'instrument à l'aide des options de lavage manuel, dilution à 0,05 %
Eau de laboratoire	Fournisseur de laboratoire général	Lavage de l'instrument (lavage manuel)
Filtre à air	Illumina, n° de référence 20022240	Nettoyage de l'air utilisé par l'instrument pour le refroidissement

Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

Utilisez toujours de l'eau de laboratoire ou de l'eau désionisée pour réaliser des procédures sur l'instrument. N'utilisez jamais d'eau courante. Utilisez exclusivement les eaux qui suivent ou des eaux de qualité équivalente :

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

Avertissements et précautions



ATTENTION

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

- 1 **Certains composants des réactifs fournis par Illumina pour utilisation avec l'instrument NextSeq 550Dx 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 un sarrau de laboratoire adapté 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 plus de renseignements relatifs à la protection de l'environnement, à la santé et à la sécurité, consultez la fiche signalétique (SDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.
- 2 Manipulez tous les échantillons de sang comme si vous les saviez infectés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), du virus de l'hépatite B humaine (VHB) ou d'autres agents pathogènes transmissibles par le sang (précautions universelles).
- 3 Le non-respect des procédures comme décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
- 4 Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de la trousse.
- 5 Les pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène dans le laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination par des produits PCR peut causer des résultats erronés et non fiables.
- 6 Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de préamplification et de postamplification aient chacune un équipement et des consommables qui leur soient réservés (p. ex., pipettes, pointes de pipette, blocs chauffants, agitateurs vortex et centrifugeuses).
- 7 La paire index-échantillon doit correspondre exactement au schéma imprimé de la plaque. Le logiciel Local Run Manager inscrit automatiquement les primers d'index associés au nom de chaque échantillon lorsque ces derniers sont entrés dans le module. On recommande à l'utilisateur de vérifier les primers d'index associés aux échantillons avant de lancer l'analyse de séquençage. Toute divergence entre le schéma de l'échantillon et de la plaque entraînera une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats erroné.
- 8 Il est vivement recommandé d'installer un logiciel antivirus fourni par l'utilisateur afin de protéger l'ordinateur des virus. Consultez le manuel de l'utilisateur pour obtenir des instructions relatives à l'installation.
- 9 N'utilisez pas l'instrument NextSeq 550Dx si l'un des panneaux a été retiré. L'utilisation de l'instrument, lorsque l'un des panneaux a été retiré, crée un risque d'exposition à la tension d'alimentation et à plusieurs tensions continues.

- 10 Ne touchez pas la platine de la Flow Cell dans le compartiment de Flow Cell. Le réchauffeur dans ce compartiment fonctionne entre 22 °C et 95 °C et peut causer des brûlures.
- 11 L'instrument pèse environ 185 lb et peut causer des blessures graves s'il tombe ou s'il est manipulé sans précaution.

Mode d'emploi

Le mode d'emploi qui suit sert à l'exécution des modules d'analyse des variants germinaux et somatiques en mode diagnostic sur l'instrument NextSeq 550Dx avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) ou la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).

Saisie des renseignements sur l'analyse

Pour obtenir des instructions détaillées, reportez-vous au Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 100000009513) et au Guide du module de Local Run Manager applicable.

Définir les paramètres

- 1 Connectez-vous à Local Run Manager.
- 2 Sélectionnez **Create Run** (Créer l'analyse), puis sélectionnez **Somatic Variant** (Variant somatique) ou **Germline Variant** (Variant germlinal).
- 3 Entrez un nom qui désignera l'analyse, du séquençage jusqu'à la fin du processus.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
- 4 **[Facultatif]** Saisissez une description de l'analyse, pour l'identifier.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
- 5 Choisissez le nombre d'échantillons et l'ensemble d'index dans la liste déroulante.
Tenez compte de ce qui suit lorsque vous faites votre sélection.
 - ▶ La liste déroulante contient le nombre d'échantillons et l'ensemble d'index. Par exemple, « 24-Set 1 » indique qu'il y a 24 échantillons à tester avec les échantillons de l'ensemble d'index 1.
 - ▶ Le numéro de l'ensemble d'index fait référence aux différents ensembles des paires d'index i5 et i7. L'ensemble 1 et l'ensemble 2 assurent la diversité des index. Deux ensembles d'index sont offerts pour aider à prévenir la déplétion d'un ensemble.
 - ▶ Choisissez le nombre d'échantillons le plus proche du nombre d'échantillons testés. Si le nombre exact d'échantillons ne figure pas dans la liste, sélectionnez le nombre le plus proche inférieur au nombre d'échantillons testés. Par exemple, si vous souhaitez tester 18 échantillons, sélectionnez 16 échantillons.
 - ▶ Les suggestions de puits d'échantillon et de combinaisons d'index qui répondent aux exigences de diversité sont surlignées en vert.

Importation des fichiers de manifeste à analyser

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



REMARQUE


Pour rendre les fichiers de manifeste accessibles pour toutes les analyses réalisées au moyen du module d'analyse des variants germinaux ou du module d'analyse des variants somatiques, ajoutez les fichiers à l'aide de la fonction Module Settings (Paramètres du module). Cette fonction exige un niveau d'accès administrateur. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 100000009513).

Sélection des échantillons à analyser


Préciser les échantillons à analyser en utilisant l'une des options suivantes, conformément aux directives qui suivent.

- ▶ **Saisie manuelle des échantillons** : Utilisez le tableau vide à l'écran Create Run (Créer l'analyse).
- ▶ **Importation des échantillons** : Accédez à un fichier externe aux valeurs séparées par des virgules (*.csv). Il est possible d'en télécharger un modèle sur l'écran Create Run (Créer une analyse).

Saisie manuelle des échantillons

- 1 Entrez un nom d'échantillon unique (*module d'analyse des variants somatiques*) ou l'identifiant de l'échantillon (*module d'analyse des variants germinaux*).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.
- 2 **[Facultatif]** Pour les échantillons de contrôle positif ou négatif, faites un clic droit et sélectionnez le type de contrôle.
La saisie du contrôle dans l'un des puits d'échantillon inscrit automatiquement le même contrôle dans le puits correspondant de l'autre pool.
- 3 **[Facultatif]** Entrez la description de l'échantillon dans le champ Description.
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.
- 4 Sélectionnez l'adaptateur d'index 1 dans la liste déroulante Index 1 (i7).
Lorsque vous utilisez les puits d'échantillons suggérés, le logiciel inscrit automatiquement les adaptateurs d'index i7 et i5 qui satisfont aux exigences de diversité d'index. Si le nombre exact d'échantillons que vous testez ne figure pas dans la liste, assurez-vous de sélectionner les adaptateurs d'index pour les puits supplémentaires.
- 5 Sélectionnez l'adaptateur d'index 2 dans la liste déroulante Index 2 (i5).
- 6 Sélectionnez un fichier de manifeste dans la liste déroulante Manifest (Manifeste).
Les échantillons du pool A requièrent un fichier de manifeste différent de celui des échantillons du pool B.
- 7 Choisissez l'une des options pour afficher, imprimer ou enregistrer le schéma de la plaque à titre de référence pour la préparation des librairies :
 - Sélectionnez l'icône  **Print** (Imprimer) pour afficher le schéma de la plaque. Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer le schéma de la plaque.
 - Sélectionnez **Export** (Exporter) pour exporter l'information sur les échantillons dans un fichier externe.
- 8 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Importation des échantillons

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

Préparation de la cartouche de réactifs

Assurez-vous de suivre attentivement les directives applicables à la cartouche de réactifs pour un séquençage réussi.

- 1 Retirez la cartouche de réactifs de son lieu de stockage maintenu entre -25 et -15 °C.
- 2 Choisissez l'une des méthodes suivantes pour décongeler les réactifs. N'immergez pas la cartouche. Après la décongélation de la cartouche, asséchez-la avant de passer à l'étape suivante.

Température	Durée de décongélation	Limite de stabilité
Bain d'eau entre 15 et 30 °C	60 minutes	Ne pas dépasser 6 heures
2 à 8 °C	7 heures	Ne pas dépasser 5 jours



REMARQUE

Si plus d'une cartouche est décongelée dans le même bain d'eau, prolongez le temps de décongélation.

- 3 Retournez la cartouche cinq fois pour mélanger les réactifs.
- 4 Inspectez le dessous de la cartouche afin de vous assurer que les réactifs sont décongelés et ne contiennent pas de précipités. Confirmez que les positions 29, 30, 31 et 32 sont décongelées, car elles sont les plus grosses et prennent plus de temps à décongeler.
- 5 Tapotez doucement sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.
Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.

Préparation de la Flow Cell

- 1 Sortez une nouvelle boîte de Flow Cell du lieu de stockage réfrigéré à une température maintenue entre 2 et 8 °C.
- 2 Retirez l'emballage en aluminium de la boîte et laissez-le à température ambiante pendant 30 minutes.

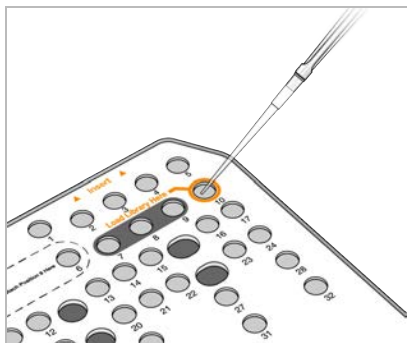
Préparation des librairies pour le séquençage

Dénaturez et diluez les librairies à un volume de chargement de 1,3 ml. En pratique, la concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation et de quantification des librairies. La dilution des librairies d'échantillons dépend de la complexité des pools d'oligonucléotides. Pour savoir comment préparer les librairies d'échantillons pour le séquençage, y compris la dilution et le regroupement de librairies, consultez la section Mode d'emploi sur la trousse de préparation de librairies applicable. L'optimisation de la densité des amplifiats sur NextSeq 550Dx est requise.

Chargement des librairies sur la cartouche de réactifs

- 1 Nettoyez l'opercule en aluminium recouvrant le réservoir n° 10 étiqueté **Load Library Here** (Charger la librairie ici) à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- 2 Percez l'opercule avec une pointe de pipette propre de 1 ml.
- 3 Chargez 1,3 ml de librairie préparée dans le réservoir n° 10 étiqueté **Load Library Here** (Charger la librairie ici). Évitez de toucher l'opercule en aluminium pendant le transfert du produit.

Figure 1 Charger les librairies



Configuration d'une analyse de séquençage

- 1 Ouvrez une session dans NextSeq 550Dx en entrant votre mot de passe du logiciel Local Run Manager.
- 2 À l'écran d'accueil du logiciel NOS, sélectionnez **Sequence** (Séquencer).

- 3 Sélectionnez une analyse dans la liste, puis cliquez sur **Next** (Suivant).
Une série d'écrans de configuration de l'analyse s'ouvre dans l'ordre suivant : Load Flow Cell (Charger la Flow Cell), Load Buffer Cartridge (Charger la cartouche de tampon), Load Reagents Cartridge (Charger la cartouche de réactifs) et Pre-Run Check (Vérification avant analyse).
- 4 Lorsque l'écran Load Flow Cell (Charger la Flow Cell) s'affiche, nettoyez et chargez la Flow Cell.
 - ▶ Sortez la Flow Cell de son emballage en aluminium.
 - ▶ Ouvrez l'emballage double coque en plastique transparent et sortez la Flow Cell.
 - ▶ Nettoyez la surface en verre de la Flow Cell à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse. Séchez le verre à l'aide d'un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
 - ▶ Assurez-vous que la surface de verre de la Flow Cell est propre. Au besoin, répétez les étapes de nettoyage.
 - ▶ Retirez la Flow Cell de l'analyse précédente.
 - ▶ Aligned la Flow Cell sur les broches d'alignement et placez-la sur la platine.
- 5 Sélectionnez **Load** (Charger).
La porte se ferme automatiquement, l'identifiant de la Flow Cell s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés.
- 6 Suivez les indications du logiciel pour vider le réservoir à réactifs usagés, charger la cartouche de tampon NextSeq 550Dx et charger la cartouche de réactifs NextSeq 550Dx.
Lorsque les cartouches de tampon et de réactifs NextSeq 550Dx sont chargées, le logiciel lit et enregistre la lecture RFID. Les identifiants des cartouches de tampon et de réactifs s'affichent à l'écran et les capteurs sont vérifiés.
- 7 Lorsque la vérification automatique avant analyse est terminée, sélectionnez **Start** (Démarrer) (étape non requise si le système est configuré pour démarrer automatiquement).
- 8 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

Real-Time Analysis (RTA) est un logiciel intégré qui exécute les analyses d'images et la définition des bases, et affecte un score de qualité à chacune des bases de chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, le module de Local Run Manager qui a été choisi dans l'instrument NextSeq 550Dx commence automatiquement l'analyse secondaire. Les processus d'analyse secondaire décrits ici concernent les modules d'analyse des variants germinaux et somatiques.

Démultiplexage

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

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

- ▶ Les échantillons sont numérotés en commençant par 1, selon l'ordre dans lequel ils sont classés pour l'analyse.
- ▶ Le numéro d'échantillon 0 est réservé aux amplifiats qui n'ont pas été assignés à un échantillon.
- ▶ Les amplifiats sont assignés à un échantillon lorsque la séquence d'indexage est identique ou lorsqu'il y a un seul mésappariement par lecture d'index.

Génération des fichiers FASTQ

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

Chaque fichier FASTQ contient des lectures pour un seul échantillon, le nom de cet échantillon est compris dans le nom du fichier FASTQ. Les modules d'analyse des variants germinaux et somatiques génèrent huit fichiers FASTQ par échantillon pour chaque pool d'oligos, quatre de la lecture 1 et quatre de la lecture 2. Il en résulte un total de huit fichiers FASTQ par échantillon pour les variants germinaux et 16 fichiers FASTQ par échantillon pour les variants somatiques. Les fichiers FASTQ constituent les principales données d'entrée pour l'alignement.

Alignement

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

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

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

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

Les alignements sont filtrés en fonction des résultats de l'alignement basés sur les taux de mésappariements par rapport à la région d'intérêt ou à l'amplicon complet, selon la longueur de l'amplicon. Les alignements filtrés sont notés dans les fichiers d'alignement comme étant non alignés et ne sont pas utilisés pour l'appel des variants.

Appel des variants

Le paramètre d'appel des variants Pisces est conçu pour générer des appels de SNV et de variants d'indels provenant des bibliothèques préparées pour l'instrument.

Rapports et fichiers de sortie supplémentaires

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

Procédures de contrôle qualité

Le logiciel NextSeq 550Dx évalue chaque analyse, échantillon et définition des bases par rapport aux indicateurs de contrôle de la qualité. Les contrôles positifs et négatifs sont aussi recommandés dans la préparation des bibliothèques et doivent faire l'objet d'une évaluation. Évaluez les contrôles comme suit :

- **Contrôle négatif (sans modèle) ou autre contrôle négatif** : Doit générer le résultat attendu. Si le contrôle négatif génère un résultat différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon, un enregistrement incorrect des primers d'indexage ou une contamination.
- **Échantillon de contrôle positif** : Doit générer le résultat attendu. Si le contrôle positif génère un résultat différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage.

Caractéristiques de performance

Les caractéristiques de performance de l'instrument NextSeq 550Dx ont été établies au moyen des modules d'analyse des variants germinaux et somatiques, de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx et de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles), et ont été validées avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Les études comprenaient l'indexage des échantillons, la contamination par transfert entre échantillons, l'entrée d'ADN, la sensibilité analytique (limite de blanc et limite de détection), l'exactitude, la précision, la comparaison des méthodes et la reproductibilité.

Les études analytiques utilisant la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) ont été conçues pour évaluer les exigences de performance précédemment établies avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles). Les résultats révèlent que les trousse de réactifs (v2 et v2.5) ont un niveau de performance comparable lorsque la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx est utilisée. Consultez la *notice d'accompagnement de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx* pour connaître les caractéristiques de performance liées aux facteurs préanalytiques, comme les méthodes d'extraction ou les substances interférentes.

Définitions des calculs utilisés dans les caractéristiques de performance

- 1 La concordance positive en pourcentage (CPP) correspond à la proportion de locus classifiés comme étant des variants par une méthode de référence qui ont été correctement analysés par le test.
 - ▶ $(\text{nombre de locus variants correctement analysés par le test}) / (\text{nombre total de locus variants})$
Les locus variants analysés par le test et qui concordent avec la méthode de référence sont des vrais positifs (TP). Les locus variants analysés comme des appels de référence ou des appels de variant différents par le test sont des faux négatifs (FN).
- 2 La concordance négative en pourcentage (CNP) correspond à la proportion de locus classifiés comme étant des variants par une méthode de référence qui ont été correctement analysés par le test.
 - ▶ $(\text{nombre de locus de type sauvage correctement analysés par le test}) / (\text{nombre total de locus de type sauvage})$
Les locus de type sauvage analysés par le test et qui concordent avec la méthode de référence sont des vrais négatifs (TN). Les locus de type sauvage analysés comme étant des variants par le test sont des faux positifs (FP).
- 3 Le pourcentage global de concordance (PGC) correspond à la proportion de locus correctement analysés par le test relativement à une méthode de référence.
 - ▶ $([\text{nombre de locus variants correctement analysés par le test}] + [\text{nombre de locus de type sauvage correctement analysés par le test}]) / ([\text{nombre total de locus variants}] + [\text{nombre total de locus de type sauvage}])$
- 4 Les calculs de la CPP, de la CNP et du PGC ne comprennent pas les absences d'appels (locus variants ou locus de référence qui ne passent pas un ou plusieurs des filtres de qualité).
- 5 Le débit d'appel autosome est calculé comme correspondant au nombre total de locus qui passent les filtres, divisé par le nombre total de positions séquencées pour les chromosomes 1 à 22; les chromosomes X et Y étant exclus. Ce paramètre ne tient pas compte de la concordance des appels avec la méthode de référence.

Performance de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles)

Indexage de l'échantillon

Les primers d'index de l'échantillon, ajoutés pendant la préparation des bibliothèques, attribuent une séquence unique à chaque échantillon d'ADN. Ces séquences uniques permettent le regroupement de multiples échantillons dans une seule analyse de séquençage. L'indexage de l'échantillon est utilisé pour les flux de travail germinale et somatique. L'objectif de cette étude était d'établir le nombre d'échantillons minimal (8) et maximal (96) pouvant être traités lors d'une seule analyse de séquençage par l'instrument NextSeq 550Dx.

Huit échantillons uniques de Platinum Genome ont été analysés avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexage par échantillon. Les résultats d'analyse des échantillons provenant de quatre analyses de séquençage utilisant le module d'analyse des variants germinaux ont été comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0.

Pour la première série d'analyses, 96 bibliothèques d'échantillons à index unique ont été analysées à l'aide d'un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 12 588 bases par brin sur les 23 chromosomes humains pour vérifier la capacité du test à faire systématiquement un appel de génotypage pour un échantillon donné sur différentes combinaisons de primers d'indexage. Pour la deuxième série d'analyses, huit bibliothèques d'échantillons à index unique ont été séquencées en deux analyses de séquençage afin de vérifier le nombre minimal d'index pris en charge.

Dans le cas des analyses de 96 index, la CPP pour les SNV allait de 98,7 % à 100 %, la CPP pour les insertions et les délétions était de 100 % et la CNP était de 100 % pour chacune des 96 combinaisons d'index. Les analyses de huit index avaient une CPP de 100 % (SNV, insertions et délétions) et une CNP de 100 % pour chacune des huit combinaisons d'index.

Contamination par transfert entre échantillons

L'instrument NextSeq 550Dx permet le séquençage de multiples échantillons et contrôles dans une seule analyse de séquençage. Une étude a été menée pour évaluer l'étendue de la contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage et entre les analyses de séquençage. Deux échantillons de Platinum Genome, un mâle et un femelle, ont été testés au moyen d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases (150 amplicons) sur 23 chromosomes différents, y compris les deux chromosomes sexuels. Les bibliothèques ont été séquencées sur l'instrument NextSeq 550Dx à l'aide du module d'analyse des variants germinaux. La contamination par transfert des échantillons mâles aux échantillons femelles a été observée par la présence de lectures d'amplicons du chromosome Y dans les échantillons femelles.

La contamination par transfert entre échantillons réalisé au cours d'une analyse de séquençage peut survenir au cours de la génération d'amplifiats, de la définition des bases du cycle de l'index et du démultiplexage des échantillons. Pour tester la contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage, un regroupement de bibliothèques composé de 46 réplicats d'échantillons mâles et femelles et de quatre contrôles négatifs a été séquencé une fois sur l'instrument NextSeq 550Dx. La contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage a été évaluée par la comparaison de la couverture des amplicons du chromosome Y de chaque réplicat femelle avec la couverture moyenne des amplicons du chromosome Y de tous les réplicats mâles du regroupement. La moyenne observée de contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage était de 0,084 %.

Pour tester la contamination par transfert entre échantillons entre les analyses de séquençage, deux regroupements de bibliothèques ont été préparés et séquencés de façon consécutive sur l'instrument NextSeq 550Dx. Le premier regroupement contenait 46 réplicats d'échantillons femelles, plus deux contrôles négatifs. Le deuxième regroupement contenait 46 réplicats d'échantillons mâles, plus deux contrôles négatifs. Les deux regroupements ont utilisé le même ensemble d'adaptateurs d'index. Le regroupement des échantillons femelles a été séquencé en premier, suivi de l'analyse de séquençage du regroupement des échantillons mâles, puis d'une autre analyse de séquençage du regroupement des échantillons femelles. La contamination par transfert entre échantillons entre les analyses de séquençage a été évaluée par la comparaison de la couverture des amplicons du chromosome Y entre les réplicats correspondants de la deuxième analyse de séquençage du regroupement des échantillons femelles et de l'analyse de séquençage du regroupement des échantillons mâles. La moyenne observée de contamination par transfert entre échantillons entre les analyses de séquençage était de 0,0076 %.

Entrée d'ADN

Sang (variants germinaux)

La plage d'entrées d'ADN provenant d'échantillons de sang pour la préparation des bibliothèques de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx au moyen du flux de travail du module d'analyse des variants germinaux a été établie pour l'instrument NextSeq 550Dx. Cette plage a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série au moyen de 13 échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents. La bibliothèque a été séquencée sur deux instruments NextSeq 550Dx avec un lot de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles).

Cinq échantillons ont été testés en double exemplaire à cinq niveaux d'entrée d'ADN allant de 250 ng à 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng et 12 ng). Huit échantillons ont été testés dans un seul réplicat à chacun des cinq niveaux d'entrée d'ADN. Pour la détermination de la précision, les génotypes des échantillons ont été comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats ont été déterminés pour chaque niveau d'entrée. La concordance positive en pourcentage (CPP) pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions) est présentée dans le [Tableau 1](#); la concordance négative en pourcentage (CNP) est présentée dans le [Tableau 2](#). Tous les niveaux d'entrée ont affiché une précision similaire. Le niveau d'entrée d'ADN recommandé pour la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx est 50 ng, les niveaux 25 ng et 100 ng représentant les limites inférieures et supérieures permettant de respecter les caractéristiques de performance.

Tableau 1 Résultats de CPP pour chaque niveau d'entrée d'ADN par type de variant

Entrée d'ADN (ng)	Type de variant	Variants prévus	TP	FN	Absence d'appel de variant	CPP (%)
12	SNV	2 412	2 381	31	0	98,7
25			2 404	8	0	99,7
50			2 403	9	0	99,6
100			2 412	0	0	100
250			2 412	0	0	100
12	Insertion	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Délétion	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tableau 2 CNP pour chaque niveau d'entrée d'ADN

Entrée d'ADN (ng)	TN	FP	Absence d'appel dans la référence	CNP (%)
12	430 940	4	26	> 99,9
25	430 936	0	34	100
50	430 936	2	32	> 99,9
100	430 942	0	28	100
250	430 942	0	28	100

FFPE (variants somatiques)

La plage d'entrées d'ADN provenant de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE) pour la préparation des bibliothèques de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx au moyen du flux de travail du module d'analyse des variants somatiques a été établie pour l'instrument NextSeq 550Dx. La plage d'entrées d'ADN a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série au moyen de trois échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents. Les lignées cellulaires GM12878 et GM12877 de Platinum Genome ont été fixées au formol et imprégnées à la paraffine avant d'en extraire l'ADN. La lignée GM12878 a été diluée avec la lignée GM12877, de sorte que les fréquences alléliques des variants (FAV) de 81 variants (55 SNV, 10 insertions et 16 délétions) se situent près de 0,025, 0,05 ou 0,10. De plus, chaque échantillon comptait 91 variants dont la FAV était supérieure et pouvait aller jusqu'à 1,0. Les échantillons ont été traités en double à cinq niveaux d'entrée d'ADN dont la moyenne du cycle de quantification delta (dCq) était de 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 et 7,8, selon la mesure de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx - FFPE CQ. Chaque bibliothèque a été séquencée sur deux instruments NextSeq 550Dx avec deux lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles). Pour la détermination de la précision, les appels de variant des échantillons ont été comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0. La concordance positive en pourcentage (CPP) pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions) est présentée dans le [Tableau 3](#); la concordance négative en pourcentage (CNP) est présentée dans le [Tableau 4](#). La recommandation en matière d'entrée d'ADN pour les variants dont la FAV est de 0,05 ou plus correspond à un dCq inférieur ou égal à 4,6, ce qui procure une limite inférieure permettant de respecter les caractéristiques de performance.

Tableau 3 Résultats de CPP pour chaque niveau d'entrée d'ADN par type de variant

dCq moyen	Type de variant	Variants prévus	Absences d'appel prévues	Dilution cible – FAV					
				0,025		0,05		0,10	
				Absence d'appel de variant	CPP (%)	Absence d'appel de variant	CPP (%)	Absence d'appel de variant	CPP (%)
2,1	SNV	808	Sans objet.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Insertion	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Délétion	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tableau 4 CNP pour chaque niveau d'entrée d'ADN

dCq moyen	Type sauvage prévu	Dilution cible - FAV					
		0,025		0,05		0,10	
		Absence d'appel dans la référence	CNP (%)	Absence d'appel dans la référence	CNP (%)	Absence d'appel dans la référence	CNP (%)
2,1	93 688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1 308	100	1 336	100	784	100
6,0		3 900	> 99,9	3 296	> 99,9	2 996	100
7,8		3 020	> 99,9	2 880	> 99,9	2 448	> 99,9

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

Cette étude a été menée afin d'évaluer la limite de blanc (LB) et la limite de détection (LD) pour le module d'analyse des variants somatiques sur l'instrument NextSeq 550Dx. L'étude a été réalisée avec un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents. Les lignées cellulaires GM12878 et GM12877 de Platinum Genome ont été fixées au formol et imprégnées à la paraffine avant d'en extraire l'ADN. GM12878 a été dilué avec GM12877 de façon à ce que les fréquences de 74 variants (53 SNV, sept insertions et 14 délétions) soient de $0,05 \pm 0,02$. GM12877 et GM12878 dilué (GM12878-D) ont été testés au cours de six journées consécutives avec un seul instrument, en alternance entre deux lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles), pour un total de six analyses de séquençage. Il en a résulté 60 réplicats pour chaque variant de GM12878-D et 72 réplicats pour chaque coordonnée correspondante de type sauvage de GM12877, pour chaque lot de réactifs. La LB et la LD ont été calculées au moyen des méthodes habituelles énoncées dans la norme CLSI EP17-A2 en utilisant l'option non paramétrique. La LB et la LD ont été calculées séparément pour les SNV, les insertions et les délétions en regroupant les fréquences de variants pour chaque type de variant. L'erreur de type I a été définie à 0,01 et l'erreur de type II, à 0,05.

Pour la LB, les fréquences de variants regroupées ont été classées de la moins élevée à la plus élevée, et la position arrivant au 99e rang a été calculée pour chaque lot de réactifs, pour chaque type de variant (Tableau 5). Le module d'analyse des variants somatiques utilise une limite (la LB appliquée) de 0,026 pour la fréquence allélique des variants (FAV) afin de déterminer la détection qualitative des variants. La LB calculée servait à vérifier que cette limite n'entraîne que des erreurs de type I ne dépassant pas 0,01.

Tableau 5 Limite de blanc

Type de variant	Observations totales	LB, lot de réactifs 1 (en %)	LB, lot de réactifs 2 (en %)
SNV	3 816	0,77	0,77
Insertion	504	0,56	0,56
Délétion	1 008	1,20	1,20

Pour la LD, le pourcentage de la fréquence de chaque mutation pour chaque lot de réactifs et pour chaque type de variant tombant sous la limite de 0,026 a été calculé (Tableau 6). Puisque les pourcentages étaient inférieurs à ceux des erreurs de type II, soit 5 % (0,05), la médiane des fréquences de variants combinées a été établie comme LD (Tableau 6). La LD de chaque type de variant a été utilisée comme la plus élevée des deux valeurs calculées pour les deux lots de réactifs (4,97 % pour les SNV, 5,12 % pour les insertions et 5,26 % pour les délétions).

Tableau 6 Limite de détection

Lot de réactifs	Type de variant	Observations totales	Nbre de mesures de la FAV < 2,6 %	% de mesures de la FAV < 2,6 %	Limite de détection (%)
1	SNV	3 180	53	1,7	4,94
	Insertion	420	6	1,4	5,08
	Délétion	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3 180	51	1,6	4,97
	Insertion	420	5	1,2	5,12
	Délétion	840	7	0,80	5,26

Précision

Variants germinaux

L'étude qui suit a été menée afin d'évaluer la précision de l'appel de variants du module d'analyse des variants germinaux sur l'instrument NextSeq 550Dx au moyen de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles). Treize échantillons uniques de Platinum Genome ont été testés au moyen d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases (150 amplicons) sur 23 chromosomes différents. Un total de neuf analyses ont été effectuées au moyen de trois instruments de séquençage, trois lots de réactifs et trois opérateurs au cours d'une période de cinq jours. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les délétions par la comparaison des résultats avec ceux de la méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Les régions génomiques de fiabilité ont été définies sur la base de cette méthode de référence, à moins d'indication contraire.

Tableau 7 Sommaire de la concordance germinale

Critères	Observations totales ¹	Résultat en fonction de l'observation ²	Résultat en fonction de l'analyse ³
CPP pour les SNV	819	98,7	> 99,9
CPP pour les insertions	819	95,0	98,9
CPP pour les délétions	819	100	100
CNP	819	100	100
PGC	819	> 99,9	> 99,9

¹ Calculées en fonction du nombre d'échantillons par analyse (91) x nombre d'analyses (9) = 819.

² Valeur la plus faible observée par réplicat d'échantillon lors des neuf analyses.

³ Valeur la plus faible lorsque les données provenant de chacune des analyses sont analysées de façon regroupée.

Le **Tableau 8** montre les données de l'étude présentées avec la concordance positive et négative en pourcentage, par échantillon, où les résultats des variants sont comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0 pour le calcul de la concordance positive en pourcentage (CPP). Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Étant donné que la méthode de référence ne donne des résultats que pour les variants mononucléotides et les insertions/délétions, les résultats des bases sans variants sont comparés à la séquence de référence du génome humain version hg19 pour le calcul de la concordance négative en pourcentage (CNP).

Tableau 8 Concordance des variants germinaux, par échantillon

Échantillon	Taux d'appel moyen	Variants prévus ¹	TP	FN	Absence d'appel de variant	TN	FP	CPP	CNP	PGC
NA12877	>99,9	4 788	4 788	0	0	756 762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8 505	8 379	1	125	751 464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6 048	5 985	5	58	757 701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6 993	6 930	0	63	757 638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7 875	7 811	3	61	751 653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6 300	6 174	3	123	754 803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7 119	7 056	0	63	751 905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7 182	7 119	6	57	754 146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7 686	7 560	2	124	754 173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7 245	7 182	7	56	752 469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7 119	7 119	0	0	750 645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6 804	6 804	0	0	756 065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7 434	7 371	1	62	750 015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Nombre total de variants dans tous les réplicats d'échantillons des neuf analyses.

Le [Tableau 9](#) montre les données de l'étude présentées par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée. La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions). Les positions de référence sont exclues.

Tableau 9 Concordance des variants germinaux, par échantillon, par type de variant

>Échantillon	SNV			Insertions			Délétions		
	>Prévu	>TP	>FN	>Prévu	>TP	>FN	Prévu	TP	FN
NA12877	2 331	2 331	0	1 323	1 323	0	1 134	1 134	0
NA12878	5 733	5 733	0	1 260	1 197	1	1 512	1 449	0
NA12879	3 591	3 591	0	1 323	1 260	5	1 134	1 134	0
NA12880	4 221	4 221	0	1 512	1 512	0	1 260	1 197	0
NA12881	4 914	4 913	1	1 512	1 449	2	1 449	1 449	0
NA12882	3 717	3 717	0	1 386	1 323	3	1 197	1 134	0
NA12883	4 284	4 284	0	1 449	1 449	0	1 386	1 323	0
NA12884	4 284	4 284	0	1 575	1 512	6	1 323	1 323	0
NA12885	4 725	4 725	0	1 575	1 512	2	1 386	1 323	0
NA12886	4 347	4 347	0	1 449	1 386	7	1 449	1 449	0
NA12887	4 284	4 284	0	1 323	1 323	0	1 512	1 512	0
NA12888	4 158	4 158	0	1 449	1 449	0	1 197	1 197	0
NA12893	4 599	4 599	0	1 386	1 323	1	1 449	1 449	0

Les échantillons ont également été analysés à la recherche de petites insertions et délétions (indels). Un sommaire global est présenté au [Tableau 10](#). Il y avait au total 71 indels dont la taille variait de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les délétions.

Tableau 10 Sommaire de la détection des indels germinaux

Type de variant	Variants prévus	TP	FN	Absence d'appel de variant	CPP
Insertion	18 522	18 018	27	477	99,9
Délétion	17 388	17 073	0	315	100

Le test représentatif comprenait 150 amplicons conçus pour couvrir un contenu génomique varié. La teneur en GC des amplicons allait de 0,19 à 0,87. Les amplicons comprenaient également diverses répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données ont été compilées par amplicon (Tableau 11) de façon à déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels exacts. Le pourcentage d'appels exacts se rapporte aux appels de variants et aux appels de référence et est inférieur à 100 % en cas d'appels inexacts ou d'absences d'appel.

Tableau 11 Variants germinaux – Précision au niveau de l'amplicon

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indel	0,22	76 167	0	0	100
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64 701	0	0	100
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indel	0,4	74 529	0	0	100
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indel	0,49	75 348	0	0	100
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	Poly G (5)	0,69	66 339	0	0	100
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57 330	0	0	100
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	72 072	0	0	100
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indel	0,28	73 710	0	0	100
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indel	0,38	65 520	0	0	100
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	s. o.	0,65	66 339	0	0	100
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	Poly A (8)	0,35	61 425	0	0	100
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	Poly T (5)	0,42	72 072	0	0	100
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71 253	0	0	100
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74 529	0	0	100
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Indel	0,43	76 167	0	0	100
16	2	235 016 350	235 016 422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59 787	0	0	100
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indel	0,27	74 823	0	1 344	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	s. o.	0,43	67 977	0	0	100
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indel	0,49	57 330	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72 072	0	0	100
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indel	0,57	60 543	0	63	99,9
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	Poly A (6)	0,26	63 882	0	0	100
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79 443	0	0	100
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	s. o.	0,29	63 882	0	0	100
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50 778	0	0	100
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	Poly A (5)	0,46	56 511	0	0	100
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50 778	0	0	100
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	s. o.	0,78	61 425	0	0	100
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68 796	0	0	100
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	s. o.	0,39	52 416	0	0	100
31	5	74 077 114	74 077 196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67 977	0	0	100
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	Poly T (5)	0,37	54 873	0	0	100
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74 529	0	0	100
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indel	0,43	61 425	0	0	100
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	Poly G (6)	0,68	83 538	0	0	100
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indel	0,63	75 348	0	0	100
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76 608	0	378	99,5
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	80 262	0	0	100
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indel	0,53	77 805	0	0	100
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	Poly C (6)	0,7	70 434	0	0	100
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76 986	0	0	100
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	Poly A (5)	0,44	74 529	0	0	100
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	s. o.	0,44	59 787	0	0	100
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indel	0,35	72 072	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71 253	0	0	100
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indel	0,38	69 615	0	0	100
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73 710	0	0	100
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74 529	0	0	100
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	s. o.	0,31	54 054	0	0	100
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indel	0,35	76 167	0	0	100
51	8	1 817 312	1 817 394	83	83	s. o.	0,42	67 977	0	0	100
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72 171	0	720	99,0
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indel	0,3	54 873	0	0	100
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	Poly G (6)	0,67	80 262	0	0	100
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indel	0,32	53 235	0	0	100
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	s. o.	0,49	78 624	0	0	100
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	67 977	0	0	100
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79 443	0	0	100
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63 882	0	0	100
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	74 529	0	0	100
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	Poly T (5)	0,3	64 701	0	0	100
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73 710	0	0	100
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indel	0,35	77 805	0	0	100
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indel	0,42	71 747	0	325	99,5
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	s. o.	0,49	65 520	0	0	100
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	s. o.	0,51	66 339	0	0	100
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	s. o.	0,45	78 624	0	0	100
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indel	0,46	57 330	0	0	100
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	s. o.	0,65	81 900	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	50 778	0	0	100
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	s. o.	0,59	83 538	0	0	100
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	Poly A (5)	0,4	59 787	0	0	100
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	s. o.	0,42	69 615	0	0	100
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	Poly G (6)	0,55	74 529	0	0	100
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indel	0,53	69 615	0	0	100
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69 615	0	0	100
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	69 615	0	0	100
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68 796	0	0	100
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76 167	0	0	100
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	s. o.	0,49	66 339	0	0	100
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	Poly A (6)	0,35	58 149	0	0	100
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	Poly G (5)	0,68	77 805	0	0	100
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	s. o.	0,52	59 787	0	0	100
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72 072	0	0	100
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indel	0,49	72 891	0	0	100
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indel	0,39	63 063	0	0	100
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54 873	0	0	100
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	s. o.	0,25	67 977	0	0	100
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58 642	0	326	99,4
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indel	0,38	66 339	0	0	100
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indel	0,35	74 529	0	0	100
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	Poly A (5)	0,41	54 054	0	0	100
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indel	0,62	76 986	0	0	100
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	Poly C (5)	0,45	78 624	0	0	100
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indel	0,25	55 692	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76 167	0	0	100
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	Poly T (6)	0,43	77 805	0	0	100
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indel	0,65	58 149	0	0	100
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	s. o.	0,36	74 529	0	0	100
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indel	0,56	57 330	0	0	100
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	s. o.	0,27	51 597	0	0	100
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	Poly C (5)	0,67	77 805	0	0	100
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	71 253	0	0	100
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	Poly C (5)	0,67	85 176	0	0	100
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74 529	0	0	100
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	72 891	0	0	100
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71 247	0	6	100
108	17	3 970 090	3 970 180	91	91	Indel	0,46	74 529	0	0	100
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indel	0,26	76 167	0	0	100
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	Poly T (5)	0,54	72 891	0	0	100
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66 343	27	788	98,8
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	Poly A (5)	0,34	74 529	0	0	100
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75 348	0	0	100
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indel	0,41	64 413	0	288	99,6
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	Poly T (7)	0,22	70 434	0	0	100
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	68 796	0	0	100
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	54 873	0	0	100
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	s. o.	0,37	74 529	0	0	100
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56 511	0	0	100
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61 425	0	0	100
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66 339	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indel	0,45	69 615	0	0	100
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	s. o.	0,48	53 235	0	0	100
124	19	625 143	625 241	99	99	s. o.	0,59	81 081	0	0	100
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	s. o.	0,68	60 605	1	0	100
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	s. o.	0,64	57 330	0	0	100
127	20	746 056	746 149	94	94	s. o.	0,61	76 986	0	0	100
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	67 158	0	0	100
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	62 244	0	0	100
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57 330	0	0	100
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indel	0,63	82 719	0	0	100
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indel	0,36	54 873	0	0	100
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	72 072	0	0	100
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indel	0,57	71 253	0	0	100
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indel	0,35	54 054	0	0	100
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80 262	0	0	100
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indel	0,39	71 253	0	0	100
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56 439	0	72	99,9
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73 710	0	0	100
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indel	0,63	81 900	0	0	100
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	s. o.	0,68	79 443	0	0	100
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indel	0,46	79 443	0	0	100
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	s. o.	0,6	81 081	0	0	100
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indel	0,66	75 348	0	0	100
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	Poly T (5)	0,26	56 511	0	0	100
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	Poly C (5)	0,62	56 511	0	0	100
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	s. o.	0,52	58 149	0	0	100
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	s. o.	0,55	0	0	0	s. o.

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	s. o.	0,48	0	0	0	s. o.
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	s. o.

Les résultats de séquençage pour l'échantillon NA12878 ont été comparés à un génotype d'une grande fiabilité établi pour NA12878 par le National Institutes of Standards and Technology (NIST, Institut national des normes et de la technologie) (v.2.19). Parmi les 150 amplicons, 92 étaient pleinement compris dans les régions génomiques de grande fiabilité, 41 montraient des chevauchements partiels et 17 ne comportaient aucun chevauchement avec la séquence du NIST. Il en a résulté 10 000 coordonnées par réplicat, pour comparaison. Les définitions des bases sans variant ont été comparées à la séquence du génome humain de référence version hg19. Les résultats sur la précision sont affichés dans le [Tableau 12](#).

Tableau 12 Concordance germinale de l'échantillon NA12878 avec la base de données du NIST

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux d'appel moyen	TP	FN	TN	FP	CPP	CNP	PGC
NA12878	133	> 99,9	6 552	1	610 470	0	> 99,9	100	> 99,9

D'après les données fournies par les neuf analyses de cette étude germinale, l'instrument NextSeq 550Dx peut séquencer ce qui suit de façon uniforme :

- ▶ Teneur en GC ≥ 19 % (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 19 % ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,6%)
- ▶ Teneur en GC ≤ 87 % (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 87 % ont été appelées correctement et il n'y a eu aucune absence d'appel)
- ▶ Longueurs de PolyA ≤ 9 (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une répétition PolyA de neuf nucléotides ont été appelées correctement et il n'y a eu aucune absence d'appel)
- ▶ Longueurs de PolyT ≤ 10 (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une répétition PolyT de 10 nucléotides ont été appelées correctement et il n'y a eu aucune absence d'appel)
- ▶ Longueurs de PolyG ≤ 7 (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une répétition PolyG de sept nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 1,0 %)
- ▶ Longueurs de PolyC ≤ 6 (toutes les bases définies dans 2 457 amplicons séquencés avec une répétition PolyC de six nucléotides ont été appelées correctement et il n'y a eu aucune absence d'appel)
- ▶ Longueurs de répétition de dinucléotides $\leq 11x$ (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une répétition de dinucléotides de 11x ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,5 %)
- ▶ Longueurs de répétition de trinucléotides $\leq 5x$ (toutes les bases définies dans 819 amplicons séquencés avec une répétition de trinucléotides de 5x ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,5%)
- ▶ Longueurs d'insertion ≤ 24 (66 343 bases définies sur 66 370 dans 819 amplicons séquencés avec une insertion de 24 nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 1,2 %; aucun appel inexact n'est survenu dans la région contenant l'insertion de 24 nucléotides)
- ▶ Longueurs de la délétion ≤ 25 (toutes les bases définies dans 2 457 amplicons séquencés avec une délétion de 25 nucléotides ont été appelées correctement et il n'y a eu aucune absence d'appel)

Variants somatiques

L'étude décrite ici a servi à évaluer la précision de la définition de variants du module d'analyse des variants somatiques sur l'instrument NextSeq 550Dx avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles).

Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 12 588 bases (150 amplicons) sur 23 chromosomes différents. L'ADN de Platinum Genome a été extrait de blocs traités au FFPE pour générer six échantillons uniques aux fins de l'évaluation dans le cadre de l'étude.

L'échantillon d'ADN GM12877 a été dilué avec l'échantillon d'ADN GM12878 afin de créer les échantillons GM12877-D5 et GM12877-D7 en tant qu'un ensemble de variants hétérozygotes uniques dont la fréquence des variants est d'environ 5 % et 7 %. L'échantillon d'ADN GM12878 a été dilué de façon similaire avec l'échantillon d'ADN GM12877 pour créer les échantillons GM12878-D5 et GM12878-D7. Chacun des échantillons a été testé trois fois, à l'exception des échantillons dilués, qui ont été testés en six réplicats. Un total de neuf analyses ont été effectuées au moyen de trois instruments de séquençage, trois lots de réactifs et trois opérateurs au cours d'une période de cinq jours. La

précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les délétions par la comparaison des résultats avec ceux de la méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Les régions génomiques de fiabilité ont été définies sur la base de cette méthode de référence, à moins d'indication contraire.

Tableau 13 Sommaire de la concordance somatique

Critères	Observations totales ¹	Résultat en fonction de l'observation ²	Résultat en fonction de l'analyse ³
CPP pour les SNV	378	98,9	99,9
CPP pour les insertions	378	96,9	99,9
CPP pour les délétions	378	97,1	99,9
CNP	378	> 99,9	> 99,9
PGC	378	> 99,9	> 99,9

¹ Calculées en fonction du nombre d'échantillons par analyse (42) x nombre d'analyses (9) = 378.

² Valeur la plus faible observée par réplicat d'échantillon lors des neuf analyses.

³ Valeur la plus faible lorsque les données provenant de chacune des analyses sont analysées de façon regroupée.

Le **Tableau 14** montre les données de l'étude présentées avec la concordance positive et négative exprimée en pourcentage, par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée pour le calcul de la concordance positive en pourcentage (CPP). Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Étant donné que la méthode de référence ne donne des résultats que pour les variants mononucléotides et les insertions/délétions, les résultats des bases sans variants sont comparés à la séquence de référence du génome humain version hg19 pour le calcul de la concordance négative en pourcentage (CNP).

Tableau 14 Concordance des variants somatiques, par échantillon

Échantillon	Taux d'appel moyen	Prévu	TP	FN	Absence d'appel de variant	TN	FP	CPP	CNP	PGC
GM12877	98,7	2 052	2 025	0	27	318 682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3 645	3 564	0	81	317 645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2 592	2 538	0	54	323 614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3 078	3 024	0	54	322 038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3 294	3 213	0	81	322 121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2 916	2 889	0	27	323 048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9 288	8 930	0	358	630 621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9 288	9 032	0	256	629 719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9 288	8 699	42	547	628 582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9 288	9 108	0	180	629 803	0	100	100	100

Le (**Tableau 15** montre les données de l'étude présentées par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée. La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions). Les positions de référence sont exclues.

Tableau 15 Concordance des variants somatiques, par échantillon, par type de variant

Échantillon	SNV			Insertions			Délétions		
	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2 457	2 457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1 539	1 539	0	567	540	0	486	459	0

Échantillon	SNV			Insertions			Délétions		
	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN
GM12884	1 836	1 836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2 025	2 025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1 782	1 782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5 454	5 392	0	1 782	1 647	0	2 052	1 891	0
GM12877-D7	5 454	5 406	0	1 782	1 728	0	2 052	1 898	0
GM12878-D5	5 454	5 192	28	1 782	1 651	9	2 052	1 856	5
GM12878-D7	5 454	5 445	0	1 782	1 719	0	2 052	1 944	0

Les dix échantillons ont également été analysés à la recherche de petites insertions et délétions (indels) (Tableau 16). Il y avait au total 71 indels dont la taille variait de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les délétions.

Tableau 16 Sommaire de la détection des indels somatiques

Type de variant	Variants prévus	TP	FN	Absence d'appel de variant	CPP
Insertion	10 773	10 282	9	482	99,2
Délétion	11 502	10 667	5	830	> 99,9

Les 150 amplicons ont été conçus pour couvrir un contenu génomique varié. La teneur en GC des amplicons allait de 0,19 % à 0,87 %. Les amplicons comprenaient également diverses répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données ont été compilées par amplicon (Tableau 17) de façon à déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels exacts. Le pourcentage d'appels exacts se rapporte aux appels de variants et aux appels de référence et est inférieur à 100 % en cas d'appels inexacts ou d'absences d'appel.

Tableau 17 Variants somatiques – Précision au niveau de l'amplicon

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indel	0,22	35 066	0	88	99,7
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29 827	0	35	99,9
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indel	0,4	34 202	0	283	99,2
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indel	0,49	34 613	0	163	99,5
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	Poly G (5)	0,69	30 571	0	47	99,8
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26 452	0	8	100,0
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	33 148	0	116	99,7
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indel	0,28	33 928	0	92	99,7
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indel	0,38	30 218	0	22	99,9
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	s. o.	0,65	30 616	0	2	>99,9
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	Poly A (8)	0,35	28 017	0	499	98,3
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	Poly T (5)	0,42	33 207	0	57	99,8
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32 524	9	718	97,8
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33 972	0	456	98,7
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	s. o.	0,43	35 051	0	103	99,7
16	2	235 016 350	235 016 422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27 459	0	136	99,5
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indel	0,27	34 534	0	620	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	s. o.	0,43	31 339	0	44	99,9
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indel	0,49	26 373	0	87	99,7

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32 829	0	857	97,5
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indel	0,57	27 925	0	47	99,8
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	Poly A (6)	0,26	29 327	4	162	99,4
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36 585	0	117	99,7
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	s. o.	0,29	29 427	0	57	99,8
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23 356	5	75	99,7
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	Poly A (5)	0,46	25 942	0	140	99,5
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22 944	0	560	97,6
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	s. o.	0,78	28 299	0	53	99,8
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31 658	0	94	99,7
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	s. o.	0,39	24 120	0	72	99,7
31	5	74 077 114	74 077 196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31 297	0	77	99,8
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	Poly T (5)	0,37	25 277	0	55	99,8
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34 308	0	90	99,7
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indel	0,43	28 266	0	163	99,4
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	Poly G (6)	0,68	38 489	0	67	99,8
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indel	0,63	34 730	0	46	99,9
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35 057	0	483	98,6
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36 647	0	406	98,9
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indel	0,53	35 681	0	238	99,3
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	Poly C (6)	0,7	32 438	0	70	99,8
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35 441	0	91	99,7
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	Poly A (5)	0,44	34 354	0	44	99,9
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	s. o.	0,44	27 575	0	28	99,9
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indel	0,35	33 060	0	213	99,4

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32 423	0	489	98,5
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indel	0,38	32 074	0	56	99,8
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33 791	0	281	99,2
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34 316	0	82	99,8
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	s. o.	0,31	24 901	0	47	99,8
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indel	0,35	35 067	0	87	99,8
51	8	1 817 312	1 817 394	83	83	s. o.	0,42	31 365	0	9	>99,9
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	32 781	0	890	97,4
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indel	0,3	25 228	0	146	99,4
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	Poly G (6)	0,67	36 968	0	76	99,8
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indel	0,32	24 472	0	100	99,6
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	s. o.	0,49	36 203	0	85	99,8
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	31 329	0	45	99,9
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36 472	0	201	99,5
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29 473	0	11	>99,9
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	34 188	0	213	99,4
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	Poly T (5)	0,3	29 843	0	19	99,9
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33 968	0	68	99,8
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indel	0,35	35 829	0	81	99,8
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indel	0,42	32 098	88	2 048	93,8
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	s. o.	0,49	30 217	0	28	99,9
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	s. o.	0,51	30 531	0	96	99,7
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	s. o.	0,45	36 105	0	192	99,5
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indel	0,46	26 318	0	153	99,4
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	s. o.	0,65	37 785	0	24	99,9

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	23 368	0	68	99,7
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	s. o.	0,59	38 546	0	10	> 99,9
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	Poly A (5)	0,4	27 516	0	78	99,7
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	s. o.	0,42	32 083	0	48	99,9
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	Poly G (6)	0,55	34 047	0	369	98,9
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indel	0,53	32 065	0	74	99,8
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32 083	0	47	99,9
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	32 103	0	27	99,9
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31 645	16	525	98,3
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34 824	0	330	99,1
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	s. o.	0,49	30 497	0	121	99,6
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	Poly A (6)	0,35	26 773	0	65	99,8
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	Poly G (5)	0,68	35 830	9	72	99,8
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	s. o.	0,52	27 498	0	114	99,6
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32 824	0	566	98,3
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indel	0,49	33 574	0	77	99,8
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indel	0,39	29 075	0	31	99,9
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25 313	0	13	99,9
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	s. o.	0,25	31 360	0	22	99,9
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26 499	0	717	97,4
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indel	0,38	30 494	0	133	99,6
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indel	0,35	34 313	0	86	99,7
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	Poly A (5)	0,41	24 555	0	1527	94,1
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indel	0,62	35 472	0	69	99,8
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	Poly C (5)	0,45	36 264	0	24	99,9

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indel	0,25	25 667	0	37	99,9
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34 745	0	432	98,8
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	Poly T (6)	0,43	35 870	0	40	99,9
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indel	0,65	26 762	0	76	99,7
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	s. o.	0,36	34 286	0	112	99,7
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indel	0,56	26 449	0	11	> 99,9
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	s. o.	0,27	23 809	0	5	> 99,9
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	Poly C (5)	0,67	35 860	0	50	99,9
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	32 835	0	60	99,8
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	Poly C (5)	0,67	39 177	0	144	99,6
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34 075	0	323	99,1
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	33 632	0	11	> 99,9
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32 752	0	134	99,6
108	17	3 970 090	3 970 180	91	91	Indel	0,46	34 343	0	82	99,8
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indel	0,26	35 077	0	78	99,8
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	Poly T (5)	0,54	33 553	0	89	99,7
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30 554	53	2 296	92,9
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	Poly A (5)	0,34	34 360	0	38	99,9
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	34 367	0	418	98,8
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indel	0,41	29 751	0	119	99,6
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	Poly T (7)	0,22	32 176	0	340	99,0
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	31 604	7	141	99,5
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	25 273	8	45	99,8
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	s. o.	0,37	34 386	0	12	> 99,9
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25 692	0	399	98,5
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27 923	0	893	96,9

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30 598	0	20	99,9
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indel	0,45	31 969	0	161	99,5
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	s. o.	0,48	24 531	0	48	99,8
124	19	625 143	625 241	99	99	s. o.	0,59	37 298	0	124	99,7
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	s. o.	0,68	27 881	0	109	99,6
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	s. o.	0,64	26 442	0	26	99,9
127	20	746 056	746 149	94	94	s. o.	0,61	35 501	0	31	99,9
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	30 951	0	72	99,8
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	28 686	0	42	99,9
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26 372	0	88	99,7
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indel	0,63	38 159	0	20	99,9
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indel	0,36	25 188	0	544	97,9
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	32 969	0	309	99,1
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indel	0,57	32 818	0	77	99,8
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indel	0,35	24 758	9	181	99,2
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36 902	0	160	99,6
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indel	0,39	32 841	0	48	99,9
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25 939	0	280	98,9
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33 942	0	78	99,8
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indel	0,63	37 733	0	86	99,8
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	s. o.	0,68	36 617	0	49	99,9
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indel	0,46	36 525	0	162	99,6
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	s. o.	0,6	37 398	0	24	99,9
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indel	0,66	34 754	0	22	99,9
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	Poly T (5)	0,26	26 046	0	36	99,9
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	Poly C (5)	0,62	26 019	0	63	99,8

Amplicon	Chromosome	Début de l'amplicon	Fin de l'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans les régions de fiabilité	Contenu génomique de l'amplicon	Teneur en GC	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appel	% d'appels exacts
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	s. o.	0,52	26 780	0	58	99,8
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	s. o.	0,55	0	0	0	s. o.
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	s. o.	0,48	0	0	0	s. o.
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	s. o.

Les résultats de séquençage pour l'échantillon GM12878 ont été comparés à un génotype d'une grande fiabilité établi pour NA12878 par le National Institutes of Standards and Technology (NIST, Institut national des normes et de la technologie) (v.2.19). Parmi les 150 amplicons, 92 étaient pleinement compris dans les régions génomiques de grande fiabilité, 41 montraient des chevauchements partiels et 17 ne comportaient aucun chevauchement avec la séquence du NIST. Il en a résulté 10 000 coordonnées par réplicat, pour comparaison. Les définitions des bases sans variant ont été comparées à la séquence du génome humain de référence version hg19. Les résultats sur la précision sont affichés dans le [Tableau 18](#).

Tableau 18 Concordance somatique de l'échantillon GM12878 avec la base de données du NIST

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux d'appel moyen	TP	FN	TN	FP	CPP	CNP	PGC
GM12878	133	98,8	2 808	0	258 488	0	100	100	100

D'après les données fournies par les neuf analyses de cette étude somatique, l'instrument NextSeq 550Dx peut séquencer ce qui suit de façon uniforme :

- ▶ Teneur en GC ≥ 19 % (toutes les bases définies dans 378 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 19 % ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 2,6 %)
- ▶ Teneur en GC ≤ 87 % (toutes les bases définies dans 378 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 87 % ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,6 %)
- ▶ Longueurs de PolyA ≤ 9 (toutes les bases définies dans 378 amplicons séquencés avec une répétition PolyA de neuf nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 2,5 %)
- ▶ Longueurs de PolyT ≤ 10 (toutes les bases définies dans 378 amplicons séquencés avec une répétition PolyT de dix nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est inférieur à 0,1 %)
- ▶ Longueurs de PolyG ≤ 6 (toutes les bases définies dans 2 268 amplicons séquencés avec une répétition PolyG de six nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,5 %)
- ▶ Longueurs de PolyC ≤ 6 (toutes les bases définies dans 756 amplicons séquencés avec une répétition PolyC de six nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,4 %)
- ▶ Longueurs de répétition de dinucléotides $\leq 4x$ (toutes les bases définies dans 1 890 amplicons séquencés avec une répétition de dinucléotides de 4x ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,9 %)
- ▶ Longueurs de répétition de trinucléotides $\leq 5x$ (toutes les bases définies dans 378 amplicons séquencés avec une répétition de trinucléotides de 5x ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 1,4 %)
- ▶ Longueurs de l'insertion ≤ 23 (toutes les bases définies dans 378 amplicons séquencés avec une insertion de 23 nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,8 %)
- ▶ Longueurs de la délétion ≤ 25 (toutes les bases définies dans 1 134 amplicons séquencés avec une délétion de 25 nucléotides ont été appelées correctement et le taux d'absences d'appel est de 0,7 %)

Précision

La précision de l'instrument NextSeq 550Dx a été déterminée en testant treize échantillons uniques de Platinum Genome au moyen de trois instruments, trois lots de réactifs et trois opérateurs afin de générer neuf analyses de séquençage sur une période de cinq jours. Les tests, échantillons et méthodes de référence représentatifs étaient les mêmes que ceux qui ont été utilisés pour l'étude de précision germinale. Les contributions relatives à la précision ont été déterminées par l'analyse des composantes de variance au moyen de la FAV comme variable dépendante et le calcul des écarts-types au niveau de l'instrument, du lot de réactifs, de l'opérateur et de la période ([Tableau 19](#)). Le nombre total d'observations utilisées dans l'analyse pour chacun des composants de variabilité, soit l'instrument, l'opérateur ou le lot de réactifs, était respectivement de 699, 176 et 235 pour les SNV, les insertions et les délétions.

Tableau 19 Résultats de précision pour l'instrument NextSeq 550Dx (écart-type)

Composant	Type de variant	Écart-type du composant		Écart-type total	
		Max	Médiane	Max	Médiane
Lot	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertion	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Délétion	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertion	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Délétion	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Opérateur	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertion	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Délétion	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Jour	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertion	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Délétion	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Comparaison des méthodes (plateforme de séquençage)

Des échantillons de sang entier et des échantillons FFPE ont été analysés sur les instruments NextSeq 550Dx et MiSeqDx au moyen du flux de travail germinal ou somatique de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx. La concordance de la fréquence de variants pour les échantillons de sang et les échantillons FFPE a été évaluée au moyen de multiples tests représentatifs. La [Figure 2](#) représente la corrélation de la FAV entre les deux instruments pour un test représentatif et le [Tableau 20](#) résume cette corrélation en fonction du panel de tests. D'après la forte corrélation entre les instruments MiSeqDx et NextSeq 550Dx, les caractéristiques de performance liées aux facteurs préanalytiques (p. ex., les méthodes d'extraction ou les substances interférentes) sont déterminées comme étant applicables aux deux instruments. Pour obtenir des précisions supplémentaires, consultez la notice d'accompagnement de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx.

Figure 2 Corrélation de la FAV selon les instruments MiSeqDx et NextSeq 550Dx pour les échantillons FFPE (gauche) et les échantillons de sang (droite) avec le test 1

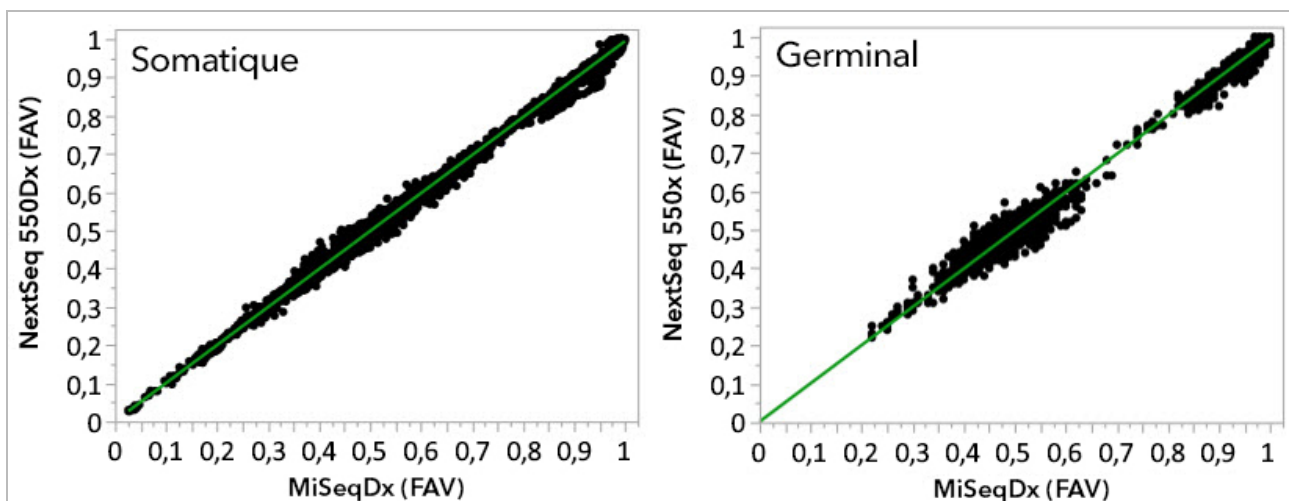


Tableau 20 Résultats de la comparaison des méthodes utilisant des échantillons de sang uniques et des échantillons FFPE

Source d'ADNg	Test (panel d'oligos)	Réplicats biologiques (échantillons)	Réplicats techniques (par échantillon)	Observations (nbre de variants)	Inclinaison	Interception	Corrélation (R ²)
Sang	Test 1	45	2	8 369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Sang	Test 2	45	2	5 457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Test 1	46	2	8 319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Test 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹ Deux points de données ont été retirés en raison de la limite indiquée pour le module d'analyse des variants germinaux.

² Coefficient de détermination des courbes de la FAV, illustrée dans le tableau 2.

Reproductibilité

La reproductibilité de l'instrument NextSeq 550Dx a été évaluée au moyen d'échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents utilisant 150 amplicons. Le test des variants germinaux comprenait sept réplicats de 13 échantillons; le test des variants somatiques comprenait six réplicats de sept échantillons à différents niveaux de FAV. Les échantillons ont été préparés à l'aide de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx.

Les tests ont été effectués dans trois sites externes avec un lot de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles). Un seul instrument NextSeq 550Dx a été utilisé à chacun des sites. Deux opérateurs ont effectué les tests à chacun des sites. Chaque opérateur a réalisé les tests pendant trois jours non consécutifs pour chacun des types d'échantillons, pour un total de 36 analyses dans les trois sites. Il en a résulté 18 analyses pour chacun des flux de travail germinaux et somatiques.

Variants germinaux

Les variants germinaux dont la FAV est supérieure ou égale à 0,2 sont déclarés comme étant positifs (variant). Dans le cas des variants germinaux positifs prévus, les données ont été évaluées pour le taux d'absences d'appel et le taux d'appels positifs exacts de chacun des types de variant (SNV, insertion, délétion). Le [Tableau 21](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 21 Observations des appels de variants germinaux pour les résultats positifs prévus selon le type de variant

Type de variant	Absence d'appel			Appel positif exact				
	Observé	Total	Pourcentage	Observé	Total	Pourcentage	NCI 95 %	NCS 95 %
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Insertions	1 026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Délétions	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Les variants germinaux dont la FAV est inférieure à 0,2 sont déclarés comme étant négatifs (type sauvage). Dans le cas des emplacements des variants germinaux négatifs prévus, les données ont été évaluées selon le taux d'absences d'appel et le taux d'appels exacts de type sauvage. Le [Tableau 22](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson.

Tableau 22 Observations des appels de variants germinaux pour les résultats négatifs prévus

Type de variant	Absence d'appel			Appel négatif exact				
	Observé	Total	Pourcentage	Observé	Total	Pourcentage	NCI 95 %	NCS 95 %
Type sauvage	4 883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Les variants germinaux ayant une FAV supérieure ou égale à 0,2 et inférieure à 0,7 sont qualifiés d'hétérozygotes positifs pour le variant et les variants ayant une FAV supérieure ou égale à 0,7 sont qualifiés d'homozygotes positifs pour le variant. Des échantillons germinaux comportant des variants hétérozygotes ont été utilisés pour déterminer si la variabilité inhérente au test influe sur la définition des génotypes. Le Cx a été déterminé pour les deux limites (0,2 pour les génotypes hétérozygotes et 0,7 pour les génotypes homozygotes), où x correspond à la proportion des tests répétés ayant excédé la limite. En ce qui a trait à la limite inférieure de FAV de 0,2, le Cx était supérieur ou égal à 99,999 %, ce qui indique qu'une proportion supérieure ou égale à 99,999 % des variants hétérozygotes serait définie comme hétérozygote. En ce qui a trait à la limite supérieure de FAV de 0,7, le Cx était inférieur ou égal à 0,001 %, ce qui indique qu'une proportion inférieure ou égale à 0,001% des variants hétérozygotes serait définie comme homozygote. Le [Tableau 23](#) résume les résultats par type de variant.

Les variants germinaux ayant une FAV supérieure ou égale à 0,2 et inférieure à 0,7 sont qualifiés d'hétérozygotes positifs pour le variant et les variants ayant une FAV supérieure ou égale à 0,7 sont qualifiés d'homozygotes positifs pour le variant. Des échantillons germinaux comportant des variants hétérozygotes ont été utilisés pour déterminer si la variabilité inhérente au test influe sur la définition des génotypes. Le Cx a été déterminé pour les deux limites (0,2 pour les génotypes hétérozygotes et 0,7 pour les génotypes homozygotes), où x correspond à la proportion des tests répétés ayant excédé la limite. En ce qui a trait à la limite inférieure de FAV de 0,2, le Cx était supérieur ou égal à 99,999 %, ce qui indique qu'une proportion supérieure ou égale à 99,999 % des variants hétérozygotes serait définie comme hétérozygote. En ce qui a trait à la limite supérieure de FAV de 0,7, le Cx était inférieur ou égal à 0,001%, ce qui indique qu'une proportion inférieure ou égale à 0,001% des variants hétérozygotes serait définie comme homozygote. Le [Tableau 23](#) résume les résultats par type de variant.

Tableau 23 Valeurs Cx germinales pour les variants hétérozygotes

Type de variant	Limite de FAV de 0,2	Limite de FAV de 0,7
	≥ C99,999 %	≤ C0,001 %
SNV	94/94	94/94
Insertions	24/24	24/24
Délétions	35/35	35/35
Total	153	153

Variants somatiques

Les variants somatiques dont la FAV est supérieure ou égale à 0,026 sont déclarés comme étant (des variants) positifs. Les observations de FAV supérieure ou égale à 0,01 et inférieure à 0,026 ont été considérées comme équivoques aux fins de cette analyse (ni positives ni négatives, marquées comme étant une fréquence de variants faible). Pour évaluer la performance, les résultats ont été calculés de trois façons :

- ▶ Meilleur cas : tout résultat équivoque a été considéré comme étant un appel positif exact (concordance avec les résultats prévus)
- ▶ Pire cas : tout résultat équivoque a été considéré comme étant un appel inexact (non-concordance avec les résultats prévus)
- ▶ Cas d'exclusion : tout résultat équivoque a été exclu de l'analyse

Trois tableaux, soit le [Tableau 24](#), le [Tableau 25](#) et le [Tableau 26](#), résument les résultats des appels, respectivement selon le scénario du meilleur cas, du pire cas et du cas d'exclusion, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 %, calculés selon la méthode de Wilson.

Tableau 24 Observations des appels de variants somatiques pour les résultats positifs prévus selon le type de variant (meilleur cas)

Type de variant	Appel positif exact				
	Observé	Total	Pourcentage	NCI 95 %	NCS 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertions	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Délétions	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tableau 25 Observations des appels de variants somatiques pour les résultats positifs prévus selon le type de variant (pire cas)

Type de variant	Appel positif exact				
	Observé	Total	Pourcentage	NCI 95 %	NCS 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertions	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Délétions	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tableau 26 Observations des appels de variants somatiques pour les résultats positifs prévus selon le type de variant (appels équivoques retirés)

Type de variant	Appel positif exact				
	Observé	Total	Pourcentage	NCI 95 %	NCS 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertions	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Délétions	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Les variants somatiques ayant une FAV inférieure à 0,01 sont signalés comme étant des appels négatifs (type sauvage). Dans le cas des emplacements des variants somatiques négatifs prévus, les données ont été évaluées selon le taux d'absences d'appel et le taux d'appels exacts de type sauvage. Les appels exacts de type sauvage ont été déterminés en excluant le taux d'absences d'appel et en soustrayant du total les appels observés qui tombaient dans la zone équivoque ($FAV \geq 0,01$ et $< 0,026$) ainsi que les appels inexacts supérieurs à la limite ($FAV \geq 0,026$). Le [Tableau 27](#) résume les résultats observés, les résultats totaux et les résultats en pourcentage pour les emplacements de variants somatiques négatifs dans le cas du taux d'absences d'appel et du taux d'appels exacts de type sauvage ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson.

Tableau 27 Observations des appels de variants somatiques pour les résultats négatifs prévus

Type de variant	Absence d'appel			Appel exact						
	Observé	Total	Pourcentage	Équivoque	Inexact	Exact	Total	Pourcentage	NCI 95 %	NCS 95 %
Type sauvage	36 326	8 909 676	0,408	2 254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Les échantillons somatiques situés à des niveaux de FAV différents pour le même variant ont été évalués en vue de déterminer le C95 du test (pour chacun des types de variant). Pour l'évaluation de la variabilité près de la limite du test, les échantillons dont la FAV prévue se situait entre 0,02 et 0,07 ont été utilisés. Le C95 a été déterminé pour chacun des variants et le C95 le plus élevé pour chacun des types de variant est indiqué dans le [Tableau 28](#).

Tableau 28 Résumé des valeurs C95 des variants somatiques

Type de variant	N	C95
SNV	74	0,0613
Insertion	24	0,0573
Délétion	33	0,0575

Performance de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles)

Vue d'ensemble

L'instrument NextSeq 550Dx s'appuie sur l'utilisation de deux trousse de réactifs : la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Afin de démontrer que la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) respecte les exigences en matière de performance analytique, vérifiées et validées avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles), les études ont été menées avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). La trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx a servi à la préparation d'une librairie traitée avec les flux de travail germinaux, et à la préparation d'une librairie traitée avec le flux de travail somatiques. Les bibliothèques traitées par chacun des flux de travail ont été testées sur trois instruments NextSeq 550Dx avec trois lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Une analyse unique avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) a aussi été effectuée pour tester chacun des flux de travail.

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

La vérification effectuée avec la trousse de réactif NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) a démontré que l'instrument NextSeq 550Dx peut détecter les variants dont la FAV est de 0,05 avec une erreur de type II inférieure ou égale à 0,05 et que la limite de 0,026 pour la FAV du module des variants somatiques (LB appliquée) comporte une erreur de type I inférieure ou égale à 0,01. En s'appuyant sur ces exigences, on peut s'attendre à ce que 95 % du temps, un variant dont la FAV est en moyenne de 0,05 obtient une FAV supérieure ou égale à 0,026, et que 99 % du temps, la position de type sauvage obtient une FAV inférieure à 0,026. Pour s'assurer que la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) répond à ces exigences, des mesures ont été prises à répétition sur l'instrument NextSeq 550Dx avec des échantillons de type sauvage (échantillons LB) et des échantillons comportant des variants dont la FAV est de 0,05 (échantillons LD), en utilisant la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Les appels qui étaient inférieurs et supérieurs à la limite de 0,026 ont ensuite été comparés aux exigences établies avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles).

Chacun des tests utilise deux échantillons LD comportant un ensemble de variants uniques ciblant une VAF de 0,05, ainsi que les échantillons LB correspondants de type sauvage pour les variants ciblés. Les échantillons LD et LB ont été traités en réplicats de huit et de sept respectivement, avec la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx. Les bibliothèques ont d'abord été séquencées en utilisant la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) afin d'identifier les variants/coordonnées génomiques requis pour l'évaluation LB/LD avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Tous les variants ayant une FAV moyenne entre 0,045 et 0,055 (variants LD), selon les résultats obtenus avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles), ont été utilisés pour l'analyse LD (N = 51 variants). Pour l'analyse LB, les 51 coordonnées génomiques correspondantes ont été évaluées.

Pour l'évaluation de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), les bibliothèques ont été séquencées lors de trois analyses, au cours de trois journées consécutives, au moyen du même instrument et du même lot de la trousse de réactifs. Les tests ont permis d'obtenir 24 réplicats pour chacun des 51 variants LD, et 21 réplicats pour chacune des positions de type sauvage correspondantes. La proportion d'appels de type sauvage ayant une FAV inférieure à 0,026 figure au [Tableau 29](#). La proportion d'appels de variants LD ayant une FAV supérieure ou égale à 0,026 figure au [Tableau 30](#).

Tableau 29 Proportion des appels inférieurs à 0,026 pour les positions de type sauvage (évaluation de l'exigence LB)

Type de variant	Positions évaluées	Observations totales	Nbre de mesures de la FAV $\geq 2,6$ %	Proportion < 2,6 %	Proportion de l'intervalle de confiance à 95 %
SNV	32	672	0	1	0,994 à 1
Insertion	11	231	0	1	0,984 à 1
Délétion	8	168	0	1	0,978 à 1

Tableau 30 Proportion des appels supérieurs ou égaux à une FAV de 0,026 pour les variants LD (évaluation de l'exigence LD)

Type de variant	Positions évaluées	Observations totales	Nbre de mesures de la FAV < 2,6 %	Nbre de mesures de la FAV ≥ 2,6 %	Proportion ≥ 2,6 %	Proportion de l'intervalle de confiance à 95 %
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 à 1
Insertion	11	264	3	261	0,989	0,967 à 0,996
Délétion	8	192	2	190	0,99	0,963 à 0,997

Précision

Variants germinaux

L'étude qui suit a été menée afin d'évaluer la précision de l'appel de variants du module d'analyse des variants germinaux au moyen de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Douze échantillons uniques de Platinum Genome ont été testés au moyen d'un test représentatif. Un total de 11 analyses ont été effectuées au moyen de trois instruments NextSeq 550Dx et de trois lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).

Le niveau de précision a été déterminé pour les SNV, les insertions et les délétions par la comparaison des résultats avec ceux de la méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats sur la précision obtenus à partir d'une seule analyse de séquençage avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) sont donnés à titre de référence. Un résumé des résultats figure au [Tableau 31](#).

Tableau 31 Sommaire de la concordance germinale

Critères	Observations totales (v2.5) ¹	Résultat en fonction de l'observation (v2.5) ²	Résultat en fonction de l'observation (v2) ³	Résultat en fonction de l'analyse (v2.5) ⁴	Résultat en fonction de l'analyse (v2) ⁴
CPP pour les SNV	1 056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
CPP pour les insertions	1 056	100	100	100	98,9
CPP pour les délétions	1 056	95,2	95,2	> 99,9	100
CNP	1 056	100	100	100	100
PGC	1 056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹ Calculées en fonction du nombre d'échantillons par analyse multiplié par le nombre d'analyses (96 échantillons par analyse x 11 analyses = 1056 observations).

² Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon parmi les valeurs de toutes les analyses (à partir de 11 analyses effectuées avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5).

³ Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon lors d'une analyse (96 observations au total).

⁴ Valeur la plus faible lorsque les données provenant de chacune des analyses sont analysées de façon regroupée.

Variants somatiques

L'étude qui suit a été menée afin d'évaluer la précision de la définition de variants du module d'analyse des variants somatiques sur l'instrument NextSeq 550Dx au moyen de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles). Dix échantillons de tissus FFPE de Platinum Genome (dont deux comportant des variants dilués à une FAV de 0,05) ont été testés au moyen d'un test représentatif. Un total de 11 analyses ont été effectuées au moyen de trois instruments NextSeq 550Dx et de trois lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).

Le niveau de précision a été déterminé pour les SNV, les insertions et les délétions par la comparaison des résultats avec ceux de la méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats sur la précision obtenus à partir d'une seule analyse de séquençage avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) sont donnés à titre de référence. Un résumé des résultats figure au [Tableau 32](#).

Tableau 32 Sommaire de la concordance somatique

Critères	Observations totales (v2.5) ¹	Résultat en fonction de l'observation (v2.5) ²	Résultat en fonction de l'observation (v2) ³	Résultat en fonction de l'analyse de l'analyse (v2.5) ⁴	Résultat en fonction de l'analyse (v2) ⁴
CPP pour les SNV	528	100	100	100	100
CPP pour les insertions	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
CPP pour les délétions	528	100	100	100	100
CNP	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
PGC	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹ Calculées en fonction du nombre d'échantillons par analyse multiplié par le nombre d'analyses (48 échantillons par analyse x 11 analyses = 528 observations).

² Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon parmi les valeurs de toutes les analyses (à partir de 11 analyses effectuées avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5).

³ Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon lors d'une analyse (96 observations au total).

⁴ Valeur la plus faible lorsque les données provenant de chacune des analyses sont analysées de façon regroupée.

Précision

Variants germinaux

La précision de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) utilisée avec le module d'analyse des variants germinaux a été évaluée au moyen d'échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif. Le test consistait à préparer une librairie unique au moyen de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx et comprenait 12 échantillons comportant chacun huit réplicats. Les librairies ont été séquencées sur trois instruments NextSeq 550Dx avec trois lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), pour un total de neuf analyses de séquençage.

Des échantillons comportant des variants hétérozygotes ont été utilisés pour déterminer si la variabilité inhérente au test influe sur l'appel des génotypes (N = 153 variants hétérozygotes uniques). Le Cx a été déterminé pour les deux limites du module d'analyse des variants germinaux (0,2 pour les génotypes hétérozygotes et 0,7 pour les génotypes homozygotes), où x correspond à la proportion des tests répétés ayant excédé la limite. En ce qui a trait à la limite inférieure de FAV de 0,2, le variant ayant la valeur Cx minimale pour la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) était supérieur à 99,9 %, ce qui indique qu'une proportion supérieure à 99,9 % des variants hétérozygotes serait définie comme hétérozygote. En ce qui a trait à la limite supérieure de FAV de 0,7, le variant ayant la valeur Cx maximale pour la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) était inférieur à 1,5 %, ce qui indique qu'une proportion inférieure ou égale à 1,5 % des variants hétérozygotes serait définie comme homozygote. Le [Tableau 33](#) résume les résultats par type de variant. Les valeurs Cx obtenues par une analyse de séquençage unique avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) sont fournies à titre de référence.

Tableau 33 Valeurs Cx germinales pour les variants hétérozygotes

Type de variant	N	Limite de FAV de 0,2		Limite de FAV de 0,7	
		Cx min. (v2.5) ¹	Cx min. (v2) ²	Cx max. (v2.5) ¹	Cx max. (v2) ²
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Insertions	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Délétions	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

¹ Les valeurs Cx sont déterminées en fonction d'un écart-type estimé à partir d'une analyse des composantes de variance.

² Les valeurs Cx sont déterminées en fonction des écarts-types des échantillons.

Variants somatiques

La précision de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles) utilisée avec le module d'analyse des variants somatiques a été évaluée au moyen d'échantillons de tissus FFPE de Platinum Genome et d'un test représentatif. Le test consistait à préparer une librairie unique au moyen de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx et comprenait deux échantillons comportant chacun huit réplicats. Les librairies ont été séquencées sur trois instruments NextSeq 550Dx avec trois lots de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), pour un total de neuf analyses de séquençage.

Les variants somatiques ayant une FAV prévue inférieure ou égale à 0,10 (N = 131 variants uniques) ont été utilisés pour évaluer la variabilité de l'instrument près de la limite du module d'analyse des variants somatiques (les variants somatiques ayant une FAV supérieure ou égale à 0,026 sont qualifiés de variants positifs). Les valeurs C95 ont été déterminées pour chacun des variants somatiques. Les valeurs C95 représentent les FAV ayant une probabilité de 95 % d'être supérieure à la limite de FAV du module d'analyse des variants somatiques. Les valeurs C95 les plus élevées selon le type de variants sont indiquées dans le [Tableau 34](#). Les valeurs C95 obtenues par une analyse de séquençage unique avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) sont fournies à titre de référence.

Tableau 34 Résumé des valeurs C95 des variants somatiques

Type de variant	Nbre de variants évalués	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insertions	24	0,062	0,061
Délétions	33	0,060	0,060

¹ Les valeurs C95 sont déterminées en fonction d'un écart-type estimé à partir d'une analyse des composantes de variance.

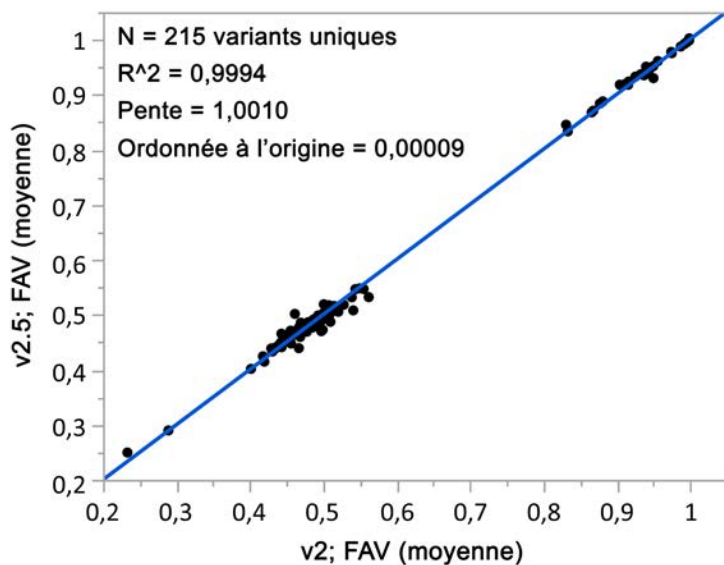
² Les valeurs C95 sont déterminées en fonction des écarts-types des échantillons.

Comparaison des méthodes (trousse de réactifs)

Variants germinaux

Les FAV moyennes de 215 variants uniques ont été évaluées en utilisant la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), et à partir des résultats générés par le module d'analyse des variants germinaux. Les moyennes des FAV ont été calculées à partir de 11 analyses de séquençage pour la version 2.5 et une analyse de séquençage pour la version 2. Un minimum de huit réplicats ont été utilisés pour calculer la moyenne de chacun des variants. La [figure 1](#) illustre la corrélation de la FAV entre les deux trousse de réactifs. D'après la corrélation fortement linéaire de la FAV et la similitude des résultats obtenus à partir de chacune des trousse de réactifs, les caractéristiques de performance, vérifiées et validées au préalable avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et le module d'analyse des variants germinaux, sont réputées être applicables à la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).

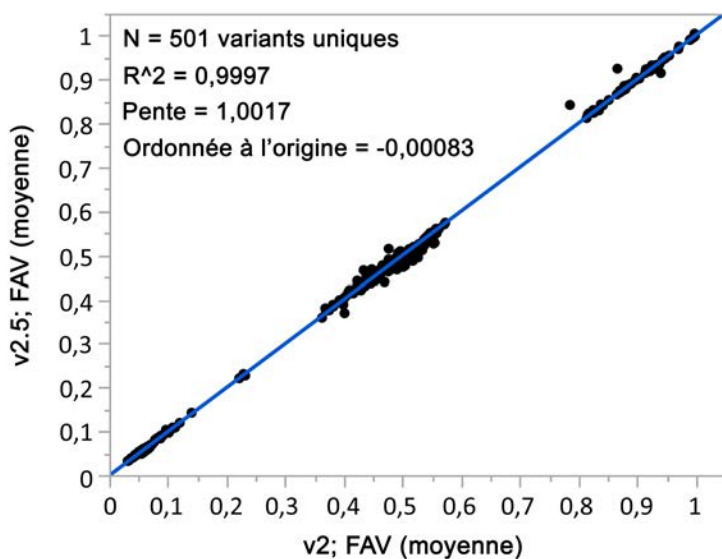
Figure 3 Corrélation entre la fréquence d'allèle des variants obtenue à partir du module d'analyse des variants germinaux avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et celle obtenue avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).



Variants somatiques

Les FAV moyennes de 501 variants uniques ont été évaluées en utilisant la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles), et à partir des résultats générés par le module d'analyse des variants somatiques. Les moyennes des FAV ont été calculées à partir de 11 analyses de séquençage pour la version 2.5 et une analyse de séquençage pour la version 2. Un minimum de trois réplicats ont été utilisés pour calculer la moyenne pour chacun des variants uniques. La [figure 1](#) illustre la corrélation de la FAV entre les deux trousse de réactifs. D'après la corrélation de la FAV et la similitude des résultats obtenus à partir de chacune des trousse de réactifs, les caractéristiques de la performance, vérifiées et validées avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et le module d'analyse des variants somatiques, sont réputées être applicables à la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).

Figure 4 Corrélation entre la fréquence d'allèle des variants obtenue à partir du module d'analyse des variants somatiques avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles) et celle obtenue avec la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé v2.5 (300 cycles).



Brevets et marques de commerce

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

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

SI UN UTILISATEUR NE LIT PAS COMPLÈTEMENT ET NE SUIT PAS EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES, IL RISQUE DE CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES, NOTAMMENT AUX UTILISATEURS ET À D'AUTRES PERSONNES, AINSI QUE D'AUTRES DOMMAGES MATÉRIELS, ANNULANT AUSSI TOUTE GARANTIE S'APPLIQUANT AU(X) PRODUIT(S).

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

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



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



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

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

Étiquette du produit

Pour voir la liste complète des symboles qui peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles, sur le site support.illumina.com, à l'onglet *Documentation & Literature* (Documentation) propre à votre trousse.