

Notice

POUR UN USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.
POUR EXPORTATION UNIQUEMENT.

Catalogue n° 20005715

Utilisation prévue

NextSeq 550Dx instrument est destiné au séquençage des bibliothèques d'ADN lorsqu'il est utilisé avec des tests de diagnostic *in vitro*. Le NextSeq 550Dx instrument doit être utilisé avec des réactifs de diagnostic *in vitro* et un logiciel d'analyse spécifiques enregistrés, certifiés et approuvés.

Principes de procédure

Illumina NextSeq 550Dx instrument est destiné au séquençage des bibliothèques d'ADN avec des tests de diagnostic *in vitro* et est destiné à être utilisé par du personnel de laboratoire clinique qualifié et formé à l'utilisation des procédures de diagnostic *in vitro* effectuées dans un laboratoire clinique. Pour son entrée, le NextSeq 550Dx utilise des bibliothèques générées à partir d'ADN où des index d'échantillons et des séquences de capture sont ajoutés aux cibles amplifiées. Les bibliothèques d'échantillons sont capturées sur une cellule de flux et séquencées sur l'instrument à l'aide d'un séquençage par chimie de synthèse (SBS). La chimie du SBS utilise une méthode de terminaison réversible pour détecter les bases de nucléotides uniques marquées par fluorescence lorsqu'elles sont incorporées dans les brins d'ADN en croissance. Le logiciel Real-Time Analysis (RTA) effectue une analyse d'image et un appel de base et attribue un score de qualité à chaque base pour chaque cycle de séquençage. Lorsque l'analyse principale est terminée, l'analyse secondaire peut être exécutée sur l'instrument pour traiter les appels de base. Le NextSeq 550Dx utilise différents modules d'analyse secondaire en fonction du flux de travail. Pour les modules de variants de lignée germinale ou somatiques, le traitement comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel de variants et la génération de fichiers de format d'appel de variants (VCF et gVCF). Les fichiers VCF et gVCF contiennent des informations sur les variants trouvées à des positions spécifiques dans un génome de référence.

Configuration à double démarrage

Le NextSeq 550Dx comprend une configuration à double démarrage pour permettre l'utilisation de l'instrument en mode diagnostic (Dx) ou en mode recherche uniquement (RUO). Les tests de séquençage diagnostique *in vitro*, y compris les modules des variants de lignée germinale et somatiques, sont exécutés en mode diagnostic.

Seuls les réactifs de séquençage IVD peuvent être utilisés en mode diagnostic. Les caractéristiques de performance et les limites de la procédure pour NextSeq 550Dx instrument ont été établies en utilisant les modules des variants de lignée germinale et Somatiques en mode diagnostic.

Limitations de la procédure

1. Pour un usage diagnostique *in vitro*.
2. Les modules de variants de lignée germinale et somatiques, lorsqu'ils sont utilisés avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) ou le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), sont capables de fournir :
 - Sortie de séquençage ≥ 90 gigabases (Gb)
 - Longueur de lecture (en fin de course appariée) 2 x 150 paires de bases (pb)
 - Bases égales ou supérieures à Q30 ≥ 75 % à la longueur de lecture de 2 x 150 pb
Égale ou supérieure à 75 % des bases ont des scores de qualité sur l'échelle de Phred ≥ 30 , indiquant une précision de l'appel de base supérieure à 99,9 %
3. Les lectures avec indels (insertions, suppressions ou combinaisons) dont la longueur du contenu est > 25 pb ne sont pas alignées par le logiciel de test. Par conséquent, les indels de longueur > 25 pb ne sont pas détectables par le logiciel de test.
4. Le logiciel de test peut ne pas aligner les lectures d'amplicon avec la teneur en variants extrêmes, ce qui entraîne le signalement de la région comme étant de type sauvage. Ce contenu extrême comprend :
 - Lectures contenant plus de trois indels
 - Lectures de longueur d'au moins 30 pb avec une teneur en variants nucléotidiques uniques (SNV) > 4 % de la longueur cible totale de l'amplicon (à l'exclusion des régions de la sonde)
 - Lectures de longueur < 30 pb avec une teneur en SNV > 10 % de la longueur totale de l'amplicon (y compris les régions de la sonde)
5. De grandes variants, y compris les variants multinucléotidiques (MNV) et les indels de grande taille, pourraient être considérées comme des variants plus petites distinctes dans le fichier VCF de sortie.
6. Les variants de suppression peuvent être filtrés ou manqués lors de l'étendue de deux amplicons tuilés si la longueur de suppression est supérieure ou égale au chevauchement entre les amplicons tuilés.
7. Le système ne peut pas détecter les indels s'ils se produisent directement à côté d'une amorce et qu'il n'y a pas d'amplicons qui se chevauchent. Pour les régions avec des amplicons qui se chevauchent, le test ne peut pas détecter les suppressions lorsque la région de chevauchement est plus petite que la taille de la suppression à détecter. Par exemple, si la région de chevauchement entre deux amplicons adjacents est deux bases, le test ne peut pas détecter de suppressions, y compris ces deux bases. Une seule suppression de base sur l'une de ces bases peut être détectée.

8. Comme pour tout flux de travail de préparation de bibliothèque basé sur l'hybridation, polymorphismes, mutations, insertions ou suppressions sous-jacentes dans les régions de liaison aux oligonucléotides peuvent affecter les allèles faisant l'objet d'une sonde et les appels effectués pendant le séquençage. Par exemple :
 - Une variant en phase avec un variant dans la région d'amorce peut ne pas être amplifié, ce qui entraîne un faux négatif
 - Des variants dans la région d'amorce pourraient empêcher l'amplification de l'allèle de référence, ce qui entraînerait un appel de variant homozygote incorrect
 - Les variants Indel dans la région de l'amorce peuvent provoquer un appel faux positif à la fin de la lecture adjacente à l'amorce
9. Les indels peuvent être filtrés en raison du biais du brin s'ils se produisent vers la fin d'une lecture et sont découplés pendant l'alignement.
10. Les petits MNV n'ont pas été validés et ne sont rapportés que dans le module de variant somatique.
11. Les suppressions sont rapportées dans le VCF à la coordonnée de la base précédente par format VCF. Par conséquent, envisagez les variants adjacents avant de signaler qu'un appel de base individuel est une référence homozygote.
12. Limites spécifiques à la lignée germinale :
 - NextSeq 550Dx instrument, utilisant le module de variant de lignée germinale Local Run Manager pour NextSeq 550Dx, est conçu pour fournir des résultats qualitatifs pour l'appel de variant de lignée germinale (par ex., homozygote, hétérozygote, de type sauvage).
 - Lorsqu'elle est utilisée avec le module de variants de lignée germinale, la couverture minimale par amplicon nécessaire pour une désignation précise des variants est de 150x. Par conséquent, 150 fragments d'ADN sont nécessaires, ce qui est équivalent à 300 lectures appariées qui se chevauchent. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées affectent la couverture. Le contenu GC et d'autres contenus génomiques peuvent affecter la couverture.
 - La variation du nombre de copies peut affecter si un variant est identifié comme homozygote ou hétérozygote.
 - Les variants dans certains contextes répétitifs sont filtrés dans les fichiers VCF. Le filtre de répétition RMxN est utilisé pour filtrer les variants si tout ou partie de la séquence de variants est présente à plusieurs reprises dans le génome de référence adjacent à la position de variant. Pour l'appel des variants de lignée germinale, au moins neuf répétitions dans la référence sont requises pour qu'un variant soit filtré. Seules les répétitions d'une longueur allant jusqu'à 5 pb sont prises en compte (R5x9).
 - Une indel et un SNV à un seul locus peuvent entraîner le signalement d'une seule variant.
13. Limites somatiques spécifiques.
 - NextSeq 550Dx instrument, en utilisant le module de variant somatique Local Run Manager pour NextSeq 550Dx, est conçu pour fournir des résultats qualitatifs pour l'appel de variant somatique (par ex. présence d'un variant somatique avec une fréquence de variant supérieure ou égale à 0,026 avec une limite de détection de 0,05).

- Lorsqu'elle est utilisée avec le module de variant somatique, la couverture minimale par amplicon nécessaire pour une désignation précise des variants est de 450x par pool d'oligonucléotides. Par conséquent, 450 fragments d'ADN sont nécessaires par pool d'oligonucléotides, ce qui est équivalent à 900 lectures appariées qui se chevauchent. Le nombre d'échantillons et le nombre total de bases ciblées affectent la couverture. Le contenu GC et d'autres contenus génomiques peuvent affecter la couverture.
- Pour l'appel des variants somatiques, au moins six répétitions dans la référence sont requises pour que le variant soit filtré, et seules les répétitions d'une longueur allant jusqu'à 3 pb sont prises en compte (R3x6).
- Le module de variants somatiques ne peut pas différencier les variants de lignée germinale des variants somatiques. Le module est conçu pour détecter les variants sur une plage de fréquences de variants, mais la fréquence des variants ne peut pas être utilisée pour différencier les variants somatiques des variants germinaux.
- Le tissu normal dans l'échantillon a un impact sur la détection des variants. La limite de détection rapportée est basée sur une fréquence de variants par rapport à l'ADN total extrait de la tumeur et du tissu normal.

Composants du produit

Le Illumina NextSeq 550Dx comprend les éléments suivants :

1. NextSeq 550Dx instrument (Catalogue n° 20005715)
2. Composants logiciels pour NextSeq 550Dx instrument, y compris ce qui suit :

Application logicielle	Fonction	Description
Logiciel d'exploitation NextSeq 550Dx (NOS)	Contrôle le fonctionnement de l'instrument	L'application logicielle NOS gère le fonctionnement de l'instrument pendant le séquençage et génère des images à utiliser par le logiciel Real-Time Analysis (RTA).
Logiciel Real-time Analysis (RTA)	Effectue l'analyse principale	L'application logicielle RTA convertit les images générées par NOS pour chaque tuile par cycle de séquençage en fichiers d'appel de base, qui représentent des entrées pour les modules d'analyse 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 dans l'instrument pour la gestion des utilisateurs, la sélection du module d'analyse approprié et la surveillance de l'état.

Application logicielle	Fonction	Description
Module de variant somatique	Effectue une analyse secondaire	Ce logiciel de module d'analyse Local Run Manager traite les appels de base par le biais d'une analyse secondaire. Le traitement comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel de variants et la création de rapports. L'appelant de variant (Pisces) génère des fichiers VCF qui contiennent des informations sur les variants trouvées à des positions spécifiques dans un génome de référence et inclut la fréquence de variant mesurée.
Module de variant de lignée germinale	Effectue une analyse secondaire	Ce logiciel de module d'analyse Local Run Manager traite les appels de base par le biais d'une analyse secondaire. Le traitement comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, l'appel de variants et la création de rapports. L'appelant de variant (Pisces) génère des fichiers VCF qui contiennent des informations sur les variants trouvées à des positions spécifiques dans un génome de référence et identifie chaque variant comme hétérozygote ou homozygote.

3. **Facultatif** Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx (catalogue n° 20086130), y compris le composant logiciel suivant :

Application logicielle	Fonction	Description
Illumina Run Manager	Interface pour la sélection du module d'application	Le logiciel Illumina Run Manager est installé sur DRAGEN server hors instrument facultatif. Illumina Run Manager permet la gestion des utilisateurs, la sélection du module d'analyse et la surveillance du séquençage et de l'état de l'analyse.

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx facultatif n'est disponible que dans certains pays. Contactez un représentant Illumina pour connaître la disponibilité régionale.

Conditions de fonctionnement

Pour plus d'informations sur les conditions de fonctionnement, consultez la section Considérations environnementales du *Guide de préparation du site de NextSeq 550Dx instrument (document n° 100000009869)*.

Élément	Spécification
Température	Maintenir une température de laboratoire comprise entre 19 °C et 25 °C (22 °C ± 3 °C). Cette température est la température de fonctionnement de l'instrument. Pendant une série, ne laissez pas la température ambiante varier de plus de ±2 °C.
Humidité	Maintenir une humidité relative sans condensation comprise entre 20 et 80 %.

Pour obtenir les dernières directives de sécurité, alertes et informations sur les systèmes Illumina, reportez-vous à [Sécurité et mise en réseau](#).

Équipements et matériaux

Équipement et matériel requis, vendus séparément

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles), catalogue n° 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), catalogue n° 20028871

Équipement et matériel requis, non fournis

Consommables fournis par l'utilisateur pour les séries de séquençage

Consommable	Fournisseur	Objectif
Lingettes imbibées d'alcool, isopropyle à 70 % ou Éthanol, 70 %	VWR, référence catalogue n° 95041-714 (ou équivalent) Fournisseur général de laboratoire	Nettoyage des cellules de flux et usage général
Tissu de laboratoire, faiblement pelucheux	VWR, référence catalogue n° 21905-026 (ou équivalent)	Nettoyage des cellules de flux et usage général

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

Consommable	Fournisseur	Objectif
NaOCl, 5 % (hypochlorite de sodium)	Sigma-Aldrich, catalogue n° 239305 (ou équivalent de qualité laboratoire)	Nettoyage de l'instrument à l'aide du nettoyage manuel post-exécution ; dilué à 0,12 %

Consommable	Fournisseur	Objectif
Tween 20	Sigma-Aldrich, catalogue n° P7949	Nettoyage de l'instrument à l'aide d'options de nettoyage manuel ; dilué à 0,05 %
Eau, qualité laboratoire	Fournisseur général de laboratoire	Nettoyage de l'instrument (nettoyage manuel)
Filtre à air	Illumina, catalogue n° 20063988	Nettoyage de l'air que l'instrument absorbe pour le refroidissement

Lignes directrices pour l'eau de qualité laboratoire

Utilisez toujours de l'eau de qualité laboratoire ou de l'eau désionisée pour effectuer les procédures de l'instrument. N'utilisez jamais d'eau du robinet. Utilisez uniquement les qualités d'eau suivantes ou équivalentes :

- Eau désionisée
- Illumina PW1
- Eau 18 mégohms (M Ω)
- Eau Milli-Q
- Eau Super-Q
- Eau de qualité biologie moléculaire

Avertissements et précautions



ATTENTION

La loi fédérale restreint la vente de ce dispositif à un médecin ou à un autre praticien agréé par la loi de l'État dans lequel il exerce, ou sur ordonnance de ce dernier, pour utiliser ou ordonner l'utilisation du dispositif.

1. **Certains composants des réactifs fournis par Illumina pour une utilisation avec NextSeq 550Dx instrument contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Des blessures corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris une protection oculaire, des gants et une blouse de laboratoire appropriés pour le risque d'exposition. Manipulez les réactifs utilisés comme déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et réglementations régionales, nationales et locales en vigueur. Pour plus d'informations sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez les fiches de données de sécurité (SDS) à notre site support.illumina.com/sds.html.**
2. Manipulez tous les échantillons de sang comme s'ils étaient connus pour être infectieux pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite B humaine (VHB) et d'autres agents pathogènes transmissibles par le sang (précautions universelles).

3. Le non-respect des procédures décrites peut entraîner des résultats erronés ou une réduction significative de la qualité de l'échantillon.
4. Prenez les précautions de laboratoire habituelles. Ne pas pipeter par la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées. Portez des gants jetables et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs du kit. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs du kit.
5. Des pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène de laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination par PCR peut entraîner des résultats inexacts et peu fiables.
6. Pour éviter toute contamination, veillez à ce que les zones de pré-amplification et de post-amplification disposent d'équipements et de consommables dédiés (p. ex., pipettes, embouts de pipettes, blocs chauffants, vortex et centrifugeuses).
7. Le couplage index/échantillon doit correspondre exactement à la disposition de la plaque imprimée. Le Local Run Manager remplit automatiquement les amorces d'index associées aux noms d'échantillons, lorsqu'elles sont saisies dans le module. Il est conseillé à l'utilisateur de vérifier que les amorces d'index sont associées aux échantillons avant de commencer le séquençage. Les discordances entre la disposition de l'échantillon et celle de la plaque entraînent une perte d'identification positive de l'échantillon et un rapport de résultats incorrect.
8. L'installation d'un logiciel antivirus fourni par l'utilisateur est fortement recommandée pour protéger l'ordinateur contre les virus. Consultez le manuel d'utilisation pour obtenir des instructions sur l'installation.
9. N'utilisez pas le NextSeq 550Dx si l'un des panneaux est retiré. L'utilisation de l'instrument avec l'un des panneaux retirés crée une exposition potentielle à la tension secteur et aux tensions continues.
10. Ne touchez pas la platine de la cellule de flux dans le compartiment de la cellule de flux. Le chauffage de ce compartiment fonctionne entre 22 °C et 95 °C et peut provoquer des brûlures.
11. L'instrument pèse environ 185 livres et peut causer des blessures graves s'il tombe ou est mal manipulé.
12. Illumina reconnaît le besoin continu de gérer les menaces de cybersécurité. Pour obtenir les dernières directives, alertes et informations de sécurité pour les systèmes Illumina, reportez-vous à [Sécurité et mise en réseau](#).

Mode d'emploi

Les instructions suivantes concernant l'utilisation du NextSeq 550Dx instrument nécessitent les réactifs fournis dans le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) ou le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).

Créer une série

Créez une série de séquençage à l'aide de Local Run Manager ou Illumina Run Manager. Les instructions d'utilisation Local Run Manager sont incluses ci-dessous et dans le Guide de référence de NextSeq 550Dx Instrument (document n° 1000000009513). Pour obtenir des instructions sur la création d'une série à l'aide de

Illumina Run Manager, reportez-vous au Guide du logiciel Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (document n° 200025239).

Pour des instructions sur la sélection entre Local Run Manager ou Illumina Run Manager, reportez-vous au Guide du logiciel Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (document n° 200025239). Pour des instructions détaillées sur des applications spécifiques, reportez-vous au module ou au guide d'application pour le test spécifique.

Les instructions suivantes concernent l'utilisation des modules des variants de lignée germinale et somatiques Local Run Manager.

Définir les paramètres

1. Connectez-vous à Local Run Manager.
2. Sélectionnez **Create Run** (Créer une série) et sélectionnez **Somatic Variant** (Variant somatique) ou **Germline Variant** (Variant germinale).
3. Saisissez un nom de série qui identifie la série depuis le séquençage jusqu'à l'analyse.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
4. [Facultatif] Entrez une description de la série pour aider à identifier la série.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
5. Sélectionnez le nombre d'échantillons et l'index défini dans la liste déroulante.
Tenez compte des informations suivantes lorsque vous faites une sélection.
 - La liste déroulante contient le nombre d'échantillons avec un ensemble d'index. Par exemple, 24-Set 1 indique 24 échantillons à tester, avec des index provenant de l'index set 1.
 - Les numéros d'index se réfèrent à différents ensembles de paires d'index i5 et i7. L'ensemble 1 et l'ensemble 2 fournissent tous deux une diversité d'index. Deux groupes d'index sont proposés pour éviter l'épuisement d'un seul groupe.
 - Choisissez le nombre d'échantillons le plus proche du nombre d'échantillons que vous analysez. Si le nombre exact d'échantillons ne figure pas dans la liste, sélectionnez le nombre le plus proche, mais inférieur au nombre que vous testez. Par exemple, si vous souhaitez tester 18 échantillons, sélectionnez 16 échantillons.
 - Les puits d'échantillon suggérés et les combinaisons d'index qui répondent aux exigences de diversité d'index sont surlignés en vert.

Importer les fichiers de manifeste pour la série

1. Assurez-vous que les manifestes que vous souhaitez importer sont disponibles dans un emplacement réseau accessible ou sur une clé USB.
2. Sélectionnez **Import Manifests** (Importer les manifestes).
3. Accédez au fichier de manifeste et sélectionnez les manifestes que vous souhaitez ajouter.

REMARQUE Pour rendre les fichiers manifestes disponibles pour toutes les séries à l'aide du module d'analyse des variants de lignée germinale ou somatiques, ajoutez des manifestes à l'aide de la fonctionnalité Paramètres du module. Cette fonctionnalité nécessite des autorisations de niveau utilisateur administrateur. Pour plus d'informations, reportez-vous au *Guide de référence de NextSeq 550Dx Instrument (document n° 1000000009513)*.

Spécifier les échantillons pour la série

Spécifiez les échantillons pour la série en utilisant l'une des options et les instructions qui suivent.

Saisir les échantillons manuellement — Utilisez le tableau vide sur l'écran Create Run (Créer une série).

Importer des échantillons — Naviguez vers un fichier externe au format de valeurs séparées par des virgules (*.csv). Un modèle peut être téléchargé sur l'écran Create Run (Créer une série).

Saisie manuelle des échantillons

1. Saisissez un nom d'échantillon unique (*module d'analyse des variants somatiques*) ou un identifiant d'échantillon (*module d'analyse des variants de lignée germinale*).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.
2. [Facultatif] Pour les échantillons de contrôle positif ou négatif, cliquez avec le bouton droit et sélectionnez le type de contrôle.
Le contrôle dans un puits d'échantillon remplit automatiquement le puits correspondant dans l'autre pool avec le même contrôle.
3. [Facultatif] Saisissez une description d'échantillon dans le champ Description d'échantillon.
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.
4. Sélectionnez un adaptateur Index 1 dans la liste déroulante Index 1 (i7).
Lorsque vous utilisez les puits d'échantillonnage suggérés, le logiciel remplit automatiquement les adaptateurs d'index i7 et i5 qui répondent aux exigences de l'index de diversité. Si le nombre exact d'échantillons que vous testez ne figure pas dans la liste, assurez-vous de sélectionner des adaptateurs d'index pour les puits supplémentaires.
5. Sélectionnez un adaptateur Index 2 dans la liste déroulante Index 2 (i5).
6. Sélectionnez un fichier manifeste dans la liste déroulante Manifeste.
Les échantillons du pool A nécessitent un manifeste différent de celui des échantillons du pool B.
7. Choisissez une option pour afficher, imprimer ou enregistrer la disposition de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques :
 - Sélectionnez l'icône  **Print** (Impression) pour afficher la disposition de la plaque. Sélectionnez **Print** (Impression) pour imprimer la disposition de la plaque.
 - Sélectionnez **Export** (Exportation) pour exporter les informations d'échantillon vers un fichier externe.
8. Sélectionnez **Save Run** (Sauvegarde de la série).

Importer des échantillons

1. Sélectionnez **Import Samples** (Importer des échantillons) et naviguez jusqu'à l'emplacement du fichier d'informations sur l'échantillon. Il existe deux types de fichiers que vous pouvez importer.
 - Sélectionnez **Template** (Modèle) sur l'écran Créer une série pour créer une nouvelle disposition de plaque. Le fichier modèle contient les en-têtes de colonne corrects pour l'importation. Saisissez les informations sur les échantillons dans chaque colonne pour les échantillons de la série. Supprimez les informations d'exemple dans les cellules non utilisées, puis enregistrez le fichier.
 - Utilisez un fichier d'informations d'échantillon qui a été exporté à partir du module Variant germinale ou Variant somatique à l'aide de la fonction Exporter.
2. Sélectionnez l'icône  **Print** (Impression) pour afficher la disposition de la plaque.
3. Sélectionnez **Print** (Impression) pour imprimer la disposition de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques.
4. Sélectionnez **Save Run** (Sauvegarde de la série).

Préparation de la cartouche de réactif

Assurez-vous de suivre attentivement les instructions de la cartouche de réactif pour un séquençage réussi.

1. Retirer la cartouche de réactif de la zone de stockage de -25°C à celle de -15°C.
2. Choisissez l'une des méthodes suivantes pour décongeler les réactifs. Ne pas immerger la cartouche. Une fois la cartouche décongelée, veuillez la sécher avant de passer à l'étape suivante.

Température	Temps de décongélation	Limite de stabilité
Bain-marie de 15 °C à 30 °C	60 minutes	Ne doit pas dépasser 6 heures
2 °C à 8 °C	7 heures	Ne doit pas dépasser 5 jours

REMARQUE Si plusieurs cartouches sont décongelées dans le même bain-marie, prévoyez un temps de décongélation supplémentaire.

3. Inversez la cartouche cinq fois pour mélanger les réactifs.
4. Inspectez le fond de la cartouche pour s'assurer que les réactifs sont décongelés et exempts de précipités. Confirmez que les positions 29, 30, 31 et 32 sont décongelées, car elles sont les plus grandes et prennent le plus de temps à décongeler.
5. Tapotez doucement sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.
Afin d'obtenir des meilleurs résultats, passez directement au chargement de l'échantillon et à la préparation de la série.

Préparation de la cellule de flux

1. Retirez une nouvelle boîte de cellules de flux d'un lieu de stockage situé entre 2 °C et 8 °C.

2. Retirez l'emballage en aluminium de la boîte et mettez-le de côté à température ambiante pendant 30 minutes.

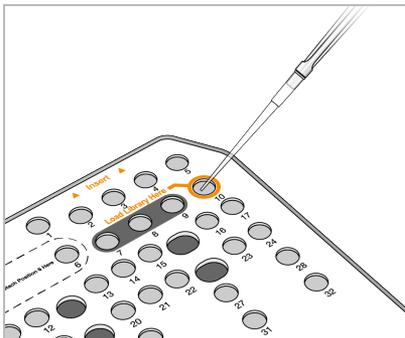
Préparer les bibliothèques pour le séquençage

Dénaturez et diluez vos bibliothèques à un volume de charge de 1,3 ml. En pratique, la concentration de charge peut varier en fonction des méthodes de préparation et de quantification de la bibliothèque. La dilution des bibliothèques d'échantillons dépend de la complexité des pools d'oligonucléotides. Pour obtenir des instructions sur la préparation des bibliothèques d'échantillons pour le séquençage, y compris la dilution et le regroupement des bibliothèques, veuillez consulter la section Instructions d'utilisation pour le kit de préparation de bibliothèque applicable. L'optimisation de la densité du goupe sur le NextSeq 550Dx est requise.

Chargement des bibliothèques sur la cartouche de réactif

1. Nettoyez le joint en aluminium recouvrant le réservoir n° 10 étiqueté **Charger la bibliothèque ici** à l'aide d'un tissu à faible peluchage.
2. Percez le joint avec un embout de pipette propre de 1 ml.
3. Chargez 1,3 ml de bibliothèques préparées dans le réservoir n° 10 étiqueté **Charger la bibliothèque ici**. Évitez de toucher le joint en aluminium lorsque vous déposez les bibliothèques.

Figure 1 Chargement des bibliothèques



Configuration d'une série de séquençage

Voir le Guide de référence de NextSeq 550Dx Instrument (document n° 1000000009513) pour des instructions complètes sur la configuration de la série.

1. Connectez-vous au NextSeq 550Dx avec votre mot de passe du logiciel Local Run Manager ou Illumina Run Manager.
2. Dans l'écran d'accueil du logiciel NOS, sélectionnez **Sequence** (Séquence).
3. Sélectionnez une série dans la liste, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
Des écrans de configuration de la série s'ouvrent dans l'ordre suivant : Chargement de la cellule de flux, Chargement de la cartouche de tampon, Chargement de la cartouche de réactif et Vérification préalable à l'exécution de la série.

REMARQUE Les séries ne sont accessibles qu'en utilisant le même gestionnaire de séries utilisé lors de la planification de la série. Pour des instructions sur la configuration du logiciel Run Manager, reportez-vous à la section Guide du logiciel Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (document n° 200025239).

4. Lorsque l'écran Chargement de la cellule de flux apparaît, nettoyez puis chargez la cellule de flux.
 - Retirez la cellule de flux de l'emballage en aluminium.
 - Ouvrez l'emballage en plastique transparent et retirez la cellule de flux
 - Nettoyez la surface en verre de la cellule de flux avec une lingette imbibée d'alcool non pelucheux. Séchez le verre avec un tissu de laboratoire peu pelucheux
 - Assurez-vous que la surface en verre de la cellule de flux est propre. Si nécessaire, répétez l'étape de nettoyage.
 - Retirez la cellule de flux utilisée d'une série précédente.
 - Alignez la cellule de flux sur les broches d'alignement et placez la cellule de flux sur la platine.
5. Sélectionnez **Load** (Chargement).

La porte se ferme automatiquement, l'ID de la cellule de flux apparaît à l'écran et les capteurs sont vérifiés.
6. Suivez les instructions du logiciel pour vider le récipient de réactifs usagé, chargez la cartouche de tampon NextSeq 550Dx et chargez la cartouche de réactif NextSeq 550Dx.

Lorsque le tampon NextSeq 550Dx et les cartouches de réactifs sont chargés, le logiciel lit et enregistre la RFID. Les identifiants de tampon et de cartouche de réactif apparaissent à l'écran et les capteurs sont vérifiés.
7. Une fois la vérification automatisée préalable à la série est terminée, sélectionnez **Start** (Démarrer). (Non requise si configurée pour démarrer automatiquement.)
8. L'écran de séquençage s'ouvre lorsque la série commence. Cet écran fournit une représentation visuelle de la série en cours, y compris les intensités et les scores de qualité (Q-scores).

Résultats

Le Real-Time Analysis (RTA) est un logiciel intégré qui effectue l'analyse d'images et l'appel de base et attribue un score de qualité à chaque base pour chaque cycle de séquençage. Lorsque l'analyse principale est terminée, le module d'application sélectionné commence l'analyse secondaire d'une manière automatique. Les processus d'analyse secondaire décrits ici concernent les modules de variant de lignée germinale et somatique Local Run Manager sur NextSeq 550Dx instrument.

Démultiplexage

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

Les lectures d'index sont identifiées en suivant les étapes suivantes :

- Les échantillons sont numérotés à partir de 1 en fonction de l'ordre dans lequel ils sont répertoriés pour la série.
- Le numéro d'échantillon 0 est réservé aux groupes qui n'ont pas été attribués à un échantillon.
- Les groupes sont attribués à un échantillon lorsque la séquence d'index correspond exactement ou lorsqu'il y a jusqu'à une seule discordance par lecture d'index.

Génération de fichiers FASTQ

Après le démultiplexage, le logiciel génère des fichiers d'analyse intermédiaires au format FASTQ, qui est un format de texte utilisé pour représenter les séquences. Les fichiers FASTQ contiennent des lectures pour chaque échantillon et les scores de qualité associés. Les groupes qui n'ont pas passé le filtre sont exclus.

Chaque fichier FASTQ contient des lectures pour un seul échantillon, et le nom de cet échantillon est inclus dans le nom du fichier FASTQ. Dans les modules des variants de lignée germinale et somatiques, huit fichiers FASTQ sont générés par échantillon et par oligo pool, quatre dans la lecture 1 et quatre dans la lecture 2. Ce résultat donne un total de 8 et 16 fichiers FASTQ par échantillon pour la germinale et la somatique, respectivement. Les fichiers FASTQ sont l'entrée principale pour l'alignement.

Alignement

Pendant l'étape d'alignement, l'algorithme Smith-Waterman à bandes aligne les groupes de chaque échantillon avec les séquences d'amplicons spécifiées dans le fichier manifeste.

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

Chaque lecture d'extrémité appariée est évaluée en termes d'alignement avec les séquences de tuile pertinentes pour cette lecture.

- La lecture 1 est évaluée par rapport au complément inverse des oligos spécifiques au locus en aval (DLSO).
- La lecture 2 est évaluée par rapport aux oligos spécifiques au locus en amont (ULSO).
- Si le début d'une lecture correspond à une séquence de tuile avec pas plus d'une discordance, la longueur totale de la lecture est alignée par rapport à la cible d'amplicon pour cette séquence.
- Si le début d'une lecture correspond à une séquence de tuile avec au maximum trois différences (non-correspondances ou décalages dus à des indels en tête), la longueur totale de la lecture est alignée par rapport à la cible d'amplicon pour cette séquence.
- Les indels dans les DLSO et les ULSO ne sont pas observés compte tenu de la chimie du test.

Les alignements sont filtrés à partir des résultats d'alignement en fonction des taux de discordance sur la région d'intérêt ou l'amplicon complet, en fonction de la longueur de l'amplicon. Les alignements filtrés sont écrits dans les fichiers d'alignement comme non alignés et ne sont pas utilisés dans les appels de variants.

Appel de variant

L'appelant du variant Pisces est conçu pour effectuer des appels de variants SNV et indel à partir de bibliothèques préparées pour l'instrument.

Rapports et fichiers de sortie supplémentaires

Les modules d'analyse des variants produisent des rapports PDF et délimités par des tabulations (*.txt) qui affichent des mesures telles que la profondeur de séquençage et le nombre de variants. Les modules produisent également des fichiers de sortie tels que 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 cycle, échantillon et appel de base par rapport aux mesures de contrôle qualité. Les contrôles positifs et négatifs sont également recommandés dans la préparation de la bibliothèque et doivent être évalués. Évaluez les contrôles comme suit :

- **Contrôle négatif (aucun contrôle de modèle) ou autre contrôle négatif** — Doit générer le résultat attendu. Si le contrôle négatif génère un résultat différent de ce qui est attendu, une erreur possible dans le suivi des échantillons, un enregistrement incorrect des amorces d'indexation ou une contamination s'est produite.
- **Échantillon de contrôle positif** — Doit générer le résultat attendu. Si le contrôle positif génère un résultat différent de ce qui est attendu, une erreur possible dans le suivi des échantillons ou un enregistrement incorrect des amorces d'indexation s'est produite.

Caractéristiques de performance

Les caractéristiques de performance du NextSeq 550Dx instrument ont été établies à l'aide des modules des variants de lignée germinale et Somatiques avec le TruSeq Custom Amplicon Kit Dx et le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) et confirmées à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Les études comprenaient l'indexation des échantillons, le report des échantillons, l'entrée d'ADN, la sensibilité analytique (limite de blanc/limite de détection), l'exactitude, la précision, la comparaison des méthodes et la reproductibilité.

Les études analytiques utilisant le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) ont été conçues pour évaluer les revendications de performance précédemment établies avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Les résultats démontrent que les kits de réactifs (v2 et v2.5) ont des performances comparables avec le TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Consultez la *notice du TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* pour connaître les caractéristiques de performance liées aux facteurs pré-analytiques, tels que les méthodes d'extraction ou les substances interférentes.

Définitions des calculs utilisés dans les caractéristiques de performance

1. Le pourcentage de concordance positive (PPA) est calculé comme la proportion de loci classée comme variants par une méthode de référence que le test rapporte correctement.
 - $(\text{nombre de loci de variants correctement rapportés par le test}) / (\text{nombre total de loci de variants})$
Les loci de variants rapportés par le test qui sont concordants avec la méthode de référence sont des vrais positifs (TP). Les loci de variants rapportés comme appels de référence ou comme différents appels des variants par le test sont des faux négatifs (FN).
2. Le pourcentage de concordance négative (NPA) est calculé comme la proportion de loci classée comme de type sauvage par une méthode de référence que le test rapporte correctement.
 - $(\text{nombre de loci de type sauvage correctement rapportés par le test}) / (\text{nombre total de loci de type sauvage})$
Les loci de type sauvage rapportés par le test qui concordent avec la méthode de référence sont des vrais négatifs (TN). Les loci de type sauvage signalés comme variants par le test sont des faux positifs (FP).
3. Le pourcentage de concordance globale (OPA) est calculé comme la proportion de loci correctement rapportée par le test par rapport à une méthode de référence.
 - $((\text{nombre de loci de variants correctement rapportés par le test}) + (\text{nombre de loci de type sauvage correctement rapportés par le test})) / ((\text{nombre total de loci de variants}) + (\text{nombre total de loci de type sauvage}))$
4. Les calculs du PPA, du NPA et du OPA n'incluent pas d'appels (loci de variants ou de référence ne répondant pas à un ou plusieurs filtres qualité).
5. Le taux d'appel autosomique est calculé comme le nombre total de filtres de passage de loci divisé par le nombre total de positions séquencées pour les chromosomes 1 à 22 ; les chromosomes X et Y sont exclus. Cette mesure ne tient pas compte de l'accord des appels avec la méthode de référence.

Performances du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)

Indexation des échantillons

Les amorces d'index d'échantillon, ajoutées pendant la préparation de la bibliothèque, attribuent une séquence unique à chaque ADN d'échantillon. Ces séquences uniques permettent de regrouper plusieurs échantillons en une seule série de séquençage. L'indexation des échantillons est utilisée pour les flux de travail germinaux et somatiques. L'objectif de cette étude était d'établir le nombre minimum (8) et maximum (96) d'échantillons pouvant être traités en un seul séquençage exécuté par NextSeq 550Dx instrument. Huit échantillons uniques

de génome en platine ont été testés avec 12 combinaisons d'amorces d'indexation différentes par échantillon. Les résultats des échantillons de quatre séries de séquençage utilisant le module de variants de lignée germinale ont été comparés à ceux de la version 2016-1.0 des génomes en platine.

Pour le premier ensemble de séries, 96 bibliothèques d'échantillons à indexation unique ont été testées avec un test représentatif conçu pour interroger une variété de gènes couvrant 12 588 bases par brin sur les 23 chromosomes humains afin de vérifier la capacité du test à effectuer un appel de génotypage de manière cohérente pour un échantillon donné dans différentes combinaisons d'amorces d'indexation. Pour le deuxième ensemble de séries, huit bibliothèques d'échantillons indexées de manière unique ont été séquencées dans deux séries de séquençage pour vérifier le nombre minimum d'index pris en charge.

Pour les séries 96-index, le PPA pour les SNV était compris entre 98,7 % et 100 %, le PPA pour les insertions et les suppressions était de 100 % et le NPA était de 100 % pour chacune des 96 combinaisons d'index. Les séries 8-index présentaient des valeurs PPA de 100 % (SNV, insertions et suppressions) et un NPA de 100 % pour chacune des huit combinaisons d'index.

Report d'échantillon

NextSeq 550Dx instrument permet le séquençage de plusieurs échantillons plus des contrôles en une seule série de séquençage. Une étude a été menée pour évaluer l'étendue du transfert d'échantillon dans d'une série de séquençage (à l'intérieur du cycle) et entre les séries de séquençage (d'une série à l'autre). Deux échantillons de génome en platine, un homme et une femme, ont été testés avec un test représentatif conçu pour interroger divers gènes couvrant 12 588 bases (150 amplicons) sur 23 chromosomes différents, y compris les deux chromosomes sexuels. Les bibliothèques ont été séquencées sur NextSeq 550Dx instrument à l'aide du module de variants de lignée germinale. Le transfert d'échantillons mâles dans des échantillons femelles a été observé par la présence d'amplicons du chromosome Y lus dans des échantillons femelles.

Le report en cours d'exécution peut être introduit lors de la génération de groupes, de l'appel de base du cycle d'index et du démultiplexage des échantillons. Pour tester le transfert d'échantillons au cours d'un séquençage, un pool de bibliothèques composé de 46 répliquats d'échantillons mâles et femelles plus quatre contrôles sans modèle a été séquencé une fois sur NextSeq 550Dx instrument. Le report d'échantillon intra-série a été évalué en comparant la couverture d'amplicon du chromosome Y de chaque répliquat femelle à la couverture moyenne d'amplicon du chromosome Y de tous les répliquats mâles dans le pool. La médiane observée pendant le report était de 0,084 %.

Pour le test de transfert d'échantillons d'une série à l'autre, deux pools de bibliothèques ont été préparés et séquencés consécutivement sur un NextSeq 550Dx instrument. Le premier pool contenait 46 répliquats d'échantillon féminin plus deux contrôles sans modèle. Le deuxième pool contenait 46 répliquats d'échantillon mâle plus deux contrôles sans modèle. Les deux pools utilisaient le même ensemble d'adaptateurs d'index. Le pool femelle a été séquencé en premier, suivi d'un séquençage ultérieur avec le pool mâle, puis d'un autre séquençage répété du pool femelle. Le transfert d'échantillon d'une série à l'autre a été évalué en comparant la couverture des amplicons du chromosome Y entre les répliquats correspondants de la série répétée du pool femelle et de la série du pool mâle. Le report médian observé d'un cycle à l'autre était de 0,0076 %

Entrée ADN

Sang (lignée germinale)

La plage de saisie de l'ADN sanguin pour la préparation de la bibliothèque TruSeq Custom Amplicon Kit Dx à l'aide du flux de travail du module de variants de lignée germinale a été établie pour NextSeq 550Dx instrument. Cette plage a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série à l'aide de 13 échantillons de génome en platine avec un test représentatif conçu pour interroger divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents. La bibliothèque a été séquencée sur deux NextSeq 550Dx instruments à l'aide d'un lot de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Cinq échantillons ont été testés en double 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 en tant que réplicat unique à chacun des cinq niveaux d'entrée d'ADN. Pour la détermination de la précision, les génotypes des échantillons ont été comparés à ceux des génomes en platine version 2016-1.0. Les résultats ont été déterminés pour chaque niveau d'entrée. Le PPA pour chaque type de variant (SNV, insertions et suppressions) est présenté dans le [Table 1](#) ; le NPA est présenté dans le [Table 2](#). Tous les niveaux d'entrée avaient une précision similaire. L'entrée d'ADN recommandée pour le TruSeq Custom Amplicon Kit Dx est de 50 ng avec 25 ng et 100 ng, ce qui fournit une limite inférieure et supérieure pour répondre aux caractéristiques de performance.

Table 1 Résultats du PPA pour chaque entrée d'ADN par type de variant

Entrée ADN (ng)	Type de variant	Variants attendues	TP	FN	Variant sans appels	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	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	Suppression	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

Table 2 NPA pour chaque entrée d'ADN

Entrée ADN (ng)	TN	FP	Référence avec aucun appel	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Somatique)

La plage d'entrée d'ADN fixé au formol et paraffiné (FFPE) pour la préparation de la bibliothèque TruSeq Custom Amplicon Kit Dx à l'aide du flux de travail de module de variants somatiques a été établie pour l'instrument NextSeq 550Dx. La plage d'entrée de l'ADN a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série à l'aide de trois échantillons de génome en platine avec un test représentatif conçu pour interroger divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents. Les lignées cellulaires du génome en platine GM12878 et GM12877 ont été fixées au formol et incluses dans la paraffine, suivies de l'extraction de l'ADN. Le GM12878 a été dilué avec le GM12877 de sorte que les fréquences alléliques des variants (VAF) de 79 variants (55 SNV, 9 insertions et 15 suppressions) étaient proches de 0,025, 0,05 ou 0,10. En outre, chaque échantillon présentait 91 variants avec des fréquences de variants plus élevées allant jusqu'à 1,0 VAF. Les échantillons ont été traités en double à cinq niveaux d'entrée d'ADN avec un cycle quantitatif delta moyen (dCq) de 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 et 7,8 tel que mesuré par le TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Chaque bibliothèque a été séquencée sur deux NextSeq 550Dx instruments à l'aide de deux lots de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Pour la détermination de la précision, les appels de variants d'échantillon ont été comparés à la version 2016-1.0 des génomes en platine. Le PPA pour chaque type de variant (SNV, insertions et suppressions) est présenté dans le [Table 3](#) ; le NPA est présenté dans le [Table 4](#). L'entrée d'ADN recommandée pour les variants à 0,05 VAF ou plus est dCq ≤ 4 avec 4,6 fournissant une limite inférieure pour répondre aux caractéristiques de performance.

Table 3 Résultats du PPA pour chaque entrée d'ADN par type de variant

dCq médiane	Type de variant	Variants attendues	Aucun appel prévu	Dilution cible VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Variants sans appels	PPA (%)	Variants sans appels	PPA (%)	Variants sans appels	PPA (%)
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	Suppression	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

Table 4 NPA pour chaque entrée d'ADN

dCq médiane	Type sauvage attendu	Dilution cible VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Référence avec aucun appel	NPA (%)	Référence avec aucun appel	NPA (%)	Référence avec aucun appel	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	> 99,9	3296	> 99,9	2996	100
7,8		3020	> 99,9	2880	> 99,9	2448	> 99,9

Sensibilité analytique (limite de blanc [LoB] et limite de détection [LoD])

Cette étude a été menée pour évaluer la limite de blanc (LoB) et la limite de détection (LoD) pour le module des variants somatiques sur NextSeq 550Dx instrument. Cela a été réalisé à l'aide d'un test représentatif conçu pour interroger divers gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents. Les lignées cellulaires du génome en platine GM12878 et GM12877 ont été fixées au formol et incluses dans la paraffine, suivies de l'extraction de l'ADN. Le GM12878 a été dilué avec le GM12877 de sorte que les fréquences des variants de 74 variants (53 SNV, 7 insertions et 14 suppressions) étaient de $0,05 \pm 0,02$. Le GM12877 et le GM12878 dilué (GM12878-D) ont été testés sur six jours consécutifs de début avec un seul instrument, en alternance entre deux lots du kit de réactifs à haute sortie v2 NextSeq 550Dx (300 cycles), pour un total de six séries de séquençage. Ce test a donné lieu à 60 réplicats pour chaque variant dans GM12878-D et 72 réplicats pour chaque coordonnée de type sauvage correspondante dans GM12877 pour chaque lot de réactifs. La LoB et la LoD ont été calculées en utilisant l'approche classique indiquée dans le CLSI EP17-A2 en utilisant l'option non paramétrique. La LoB et la LoD ont été calculées séparément pour les SNV, les insertions et les suppressions en regroupant les fréquences des variants pour un type de variant donné. L'erreur de type I était définie comme 0,01 et l'erreur de type II était définie comme 0,05.

Pour la LoB, les fréquences des variants regroupées ont été triées de la plus basse à la plus élevée, et la position du 99e rang pour chaque lot de réactifs pour chaque type de variant a été calculée (Table 5). Le module de variants somatiques utilise un seuil (la LoB effective) de 0,026 VAF pour déterminer la détection qualitative des variants. La LoB calculée a vérifié que ce seuil entraîne une erreur de type I de 0,01 maximum.

Table 5 Limite de blanc

Type de variant	Total des observations	LoB Réactif Lot 1 (%)	LoB Réactif Lot 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insertion	504	0,56	0,56
Suppression	1008	1,20	1,20

Pour la LoD, le pourcentage de fréquence de mutation individuelle pour chaque lot de réactifs pour chaque type de variant tombant en dessous du seuil de 0,026 a été calculé dans le Table 6. Étant donné que les pourcentages étaient inférieurs à l'erreur de type II de 5 % (0,05), la médiane des fréquences des variants combinées a été calculée comme la LoD (Table 6). La LoD pour chaque type de variant a été prise comme la plus grande 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 suppressions.

Table 6 Limite de détection

Lot de réactifs	Type de variant	Total des observations	Nombre de mesures VAF < 2,6 %	% de mesures VAF < 2,6 %	Limite de détection (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insertion	420	6	1,4	5,08
	Suppression	840	7	0,8	5,22

2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insertion	420	5	1,2	5,12
	Suppression	840	7	0,80	5,26

Précision

Lignée germinale

L'étude suivante a été menée pour évaluer la précision de désignation des variants du module de variants de lignée germinale sur NextSeq 550Dx instrument à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). 13 échantillons uniques de génome en platine ont été testés à l'aide d'un test représentatif conçu pour interroger une variété de gènes couvrant 12 588 bases (150 amplicons) sur 23 chromosomes différents. Au total, neuf séries ont été réalisées à l'aide de trois instruments de séquençage, trois lots de réactifs et trois opérateurs sur cinq jours de démarrage. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les suppressions en comparant les résultats à une méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Sauf indication contraire, les régions génomiques confiantes ont été définies sur la base de cette méthode de référence.

Table 7 Résumé de l'accord relatif à la lignée germinale

Critères	Total des observations ¹	Résultat par observation ²	Résultat par série ³
PPA pour SNV	819	98,7	> 99,9
PPA pour insertions	819	95,0	98,9
PPA pour suppressions	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Calculé comme le nombre d'échantillons par série (91) x nombre de séries (9) = 819.

²Valeur la plus faible observée par réplicat d'échantillon sur les 9 séries.

³Valeur la plus faible lorsque les données de chaque série sont analysées sous forme agrégée.

Le [Table 8](#) contient les données de l'étude présentées avec un pourcentage de concordance positive et négative par échantillon, où les résultats des variants sont comparés à ceux des Platinum Genomes version 2016-1.0 pour les calculs PPA. Les trois types de variants (SNV, insertions et suppressions) sont combinés. Étant donné que la méthode de référence fournit uniquement des résultats pour les variants et les insertions/suppressions de nucléotides uniques, les résultats de base non variables sont comparés à la séquence de référence du génome humain hg19 pour les calculs NPA.

Table 8 Accord relatif à la lignée germinale par échantillon

Échantillon	Taux d'appel moyen	Variants attendues ¹	TP	FN	Variant sans appels	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹ Nombre total de variants dans tous les réplicats d'échantillons sur 9 séries.

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

Table 9 Accord relatif à la lignée germinale pour chaque échantillon par type de variant

Échantillon	SNV			Insertions			Suppressions		
	Attendu	TP	FN	Attendu	TP	FN	Attendu	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0

Échantillon	SNV			Insertions			Suppressions		
	Attendu	TP	FN	Attendu	TP	FN	Attendu	TP	FN
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Les échantillons ont été analysés plus en détail pour identifier les petites insertions et suppressions (indels). Un résumé global est présenté dans le [Table 10](#). Il y avait un total de 71 indels de taille allant de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les suppressions.

Table 10 Résumé de la détection de l'indel germinale

Variant Type	Variants attendues	TP	FN	Variant sans appels	PPA
Insertion	18522	18018	27	477	99,9
Suppression	17388	17073	0	315	100

Le dosage représentatif était composé de 150 amplicons conçus pour couvrir divers contenus génomiques. La teneur en GC des amplicons allait de 0,19 à 0,87. Les amplicons présentaient également une série de répétitions de nucléotides uniques (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données ont été compilées par amplicon (Table 11) pour déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels corrects. Le pourcentage d'appels corrects est composé d'appels de variant et de référence et est inférieur à 100 % s'il y a des appels incorrects ou aucun appel.

Table 11 Précision au niveau de l'amplicon germinale

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	S.O.	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	S.O.	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	S.O.	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	S.O.	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	S.O.	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	S.O.	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	S.O.	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	S.O.	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	S.O.	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	S.O.	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	S.O.	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	S.O.	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	S.O.	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
71	11	64418856	64418957	102	102	S.O.	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	S.O.	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	S.O.	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	S.O.	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	S.O.	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	S.O.	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	S.O.	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	S.O.	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	S.O.	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	S.O.	0,59	81081	0	0	100

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
125	19	18121418	18121491	74	74	S.O.	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	S.O.	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	S.O.	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	S.O.	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	S.O.	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	S.O.	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	S.O.	0,55	0	0	0	S.O.
149	Y	2655519	2655609	91	0	S.O.	0,48	0	0	0	S.O.
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	S.O.

Les résultats du séquençage pour l'échantillon NA12878 ont été comparés à un génotype hautement fiable pour le NA12878, établi par les National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Sur les 150 amplicons, 92 amplicons étaient entièrement contenus dans les régions génomiques hautement fiables, 41 amplicons présentaient un chevauchement partiel et 17 amplicons n'avaient aucun chevauchement dans la séquence NIST. Ce résultat a donné 10 000 coordonnées par réplicat pour comparaison. Les appels de base non variables ont été comparés à la construction de la séquence de référence du génome humain hg19. Les résultats de précision sont présentés dans le [Table 12](#).

Table 12 Accord germinale de l'échantillon NA12878 avec la base de données NIST

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux d'appel moyen	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Sur la base des données fournies par cette étude germinale en neuf séries, le NextSeq 550Dx instrument peut systématiquement séquencer :

- Teneur en GC $\geq 19\%$ (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 19 % ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 0,6 %)
- Teneur en GC $\leq 87\%$ (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 87 % ont été appelées correctement sans aucun appel)
- Longueurs de polyA ≤ 9 (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés contenant une répétition de polyA de neuf nucléotides ont été appelées correctement sans aucun appel)
- Longueurs de polyT ≤ 10 (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés contenant une répétition de polyT de dix nucléotides ont été appelées correctement sans aucun appel)
- Longueurs de polyG ≤ 7 (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés contenant une répétition de polyG de sept nucléotides ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 1,0 %)
- Longueurs de polyC ≤ 6 (toutes bases appelées dans 2457 amplicons séquencés contenant une répétition de polyC de six nucléotides ont été appelées correctement sans aucun appel)
- Longueurs de répétition de dinucléotide $\leq 11x$ (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés contenant une répétition de dinucléotide 11x ont été appelées correctement avec un taux de non-appel de 0,5 %)
- Longueur des répétitions trinucleotidiques $\leq 5x$ (toutes bases appelées dans 819 amplicons séquencés contenant une répétition trinucleotidique 5x ont été appelées correctement avec un taux de non-appel de 0,5 %)
- Longueurs d'insertion ≤ 24 (66 343 sur 66 370 bases appelées dans 819 amplicons séquencés contenant une insertion de 24 nucléotides ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 1,2 % ; aucun appel incorrect n'est survenu dans la région contenant l'insertion de 24 nucléotides)

- Longueurs de suppression ≤ 25 (toutes bases appelées dans 2457 amplicons séquencés contenant une délétion de 25 nucléotides ont été appelées correctement sans aucun appel)

Somatique

L'étude décrite ici a été utilisée pour évaluer la précision de l'appel des variants du module de variants somatiques sur NextSeq 550Dx instrument en utilisant le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Cette étude a utilisé un test représentatif conçu pour interroger une variété de gènes couvrant 12 588 bases (150 amplicons) sur 23 chromosomes différents. L'ADN du génome en platine a été extrait des blocs traités par FFPE pour générer six échantillons uniques à évaluer dans l'étude.

L'ADN de l'échantillon GM12877 a été dilué avec l'ADN de l'échantillon GM12878 pour créer GM12877-D5 et GM12877-D7 comme un ensemble de variants hétérozygotes uniques avec des fréquences de variants proches de 5 % et 7 %. L'ADN de l'échantillon GM12878 a été dilué de la même manière avec l'ADN de l'échantillon GM12877 pour créer GM12878-D5 et GM12878-D7. Chacun des échantillons a été testé en triple, à l'exception des échantillons dilués, qui ont été testés en six réplicats. Au total, neuf séries ont été réalisées à l'aide de trois instruments de séquençage, trois lots de réactifs et trois opérateurs sur cinq jours de démarrage. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les suppressions en comparant les résultats à la méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Sauf indication contraire, les régions génomiques confiantes ont été définies sur la base de cette méthode de référence.

Table 13 Résumé de l'accord somatique

Critères	Total des observations ¹	Résultat par observation ²	Résultat par série ³
PPA pour SNV	378	98,9	99,9
PPA pour insertions	378	96,9	99,9
PPA pour suppressions	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Calculé comme le nombre d'échantillons par série (42) x nombre de séries (9) = 378.

²Valeur la plus faible observée par réplicat d'échantillon sur les 9 séries.

³Valeur la plus faible lorsque les données de chaque série sont analysées sous forme agrégée.

Le [Table 14](#) contient les données de l'étude présentées avec un pourcentage de concordance positive et négative par échantillon, où les résultats des variants sont comparés à la méthode de référence composite bien caractérisée pour les calculs de PPA. Les trois types de variants (SNV, insertions et suppressions) sont combinés. Étant donné que la méthode de référence fournit uniquement des résultats pour les variants et les insertions/suppressions de nucléotides uniques, les résultats de base non variables sont comparés à la séquence de référence du génome humain hg19 pour les calculs NPA.

Table 14 Accord somatique par échantillon

Échantillon	Taux d'appel moyen	Attendu	TP	FN	Variant sans appels	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

Le [Table 15](#) contient les données de l'étude présentées par échantillon, où les résultats des variants sont comparés à la méthode de référence composite bien caractérisée. La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant – SNV, insertions et suppressions. Les positions de référence sont exclues.

Table 15 Accord somatique pour chaque échantillon par type de variant

Échantillon	SNV			Insertions			Suppressions		
	Attendu	TP	FN	Attendu	TP	FN	Attendu	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Les dix échantillons ont été analysés plus en détail pour identifier les petites insertions et suppressions (indels) (Table 16). Il y avait un total de 71 indels de taille allant de 1 à 24 pb pour les insertions et de 1 à 25 pb pour les suppressions.

Table 16 Résumé de la détection de l'indel somatique

Type de variant	Variants attendues	TP	FN	Variant sans appels	PPA
Insertion	10773	10282	9	482	99,2
Suppression	11502	10667	5	830	> 99,9

Les 150 amplicons ont été conçus pour couvrir divers contenus génomiques. La teneur en GC des amplicons allait de 0,19 à 0,87 %. Les amplicons présentaient également une série de répétitions de nucléotides uniques (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données ont été compilées par amplicon (Table 17) pour déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels corrects. Le pourcentage d'appels corrects est composé d'appels de variant et de référence et est inférieur à 100 % s'il y a des appels incorrects ou aucun appel.

Table 17 Précision somatique au niveau de l'amplicon

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	S.O.	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	S.O.	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	S.O.	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	S.O.	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	S.O.	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	S.O.	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	S.O.	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	S.O.	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	S.O.	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	S.O.	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	S.O.	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	S.O.	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	S.O.	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	S.O.	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
71	11	64418856	64418957	102	102	S.O.	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	S.O.	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	S.O.	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	S.O.	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	S.O.	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	S.O.	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	S.O.	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	S.O.	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	S.O.	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	S.O.	0,59	37298	0	124	99,7

Amplicon	Chromosome	Démarrage d'amplicon	Fin d'amplicon	Taille du fragment analysé	Bases dans des régions de confiance	Contenu génomique d'amplicon	Contenu GC	Appels corrects	Appels incorrects	Aucun appel	% d'appels corrects
125	19	18121418	18121491	74	74	S.O.	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	S.O.	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	S.O.	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	S.O.	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	S.O.	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	S.O.	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	S.O.	0,55	0	0	0	S.O.
149	Y	2655519	2655609	91	0	S.O.	0,48	0	0	0	S.O.
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	S.O.

Les résultats du séquençage pour l'échantillon GM12878 ont été comparés à un génotype hautement confiant pour le NA12878, établi par les National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Sur les 150 amplicons, 92 amplicons étaient entièrement contenus dans les régions génomiques hautement confiantes, 41 amplicons présentaient un chevauchement partiel et 17 amplicons n'avaient aucun chevauchement dans la séquence NIST. Ce résultat a donné 10 000 coordonnées par réplicat pour comparaison. Les appels de base non variables ont été comparés à la construction de la séquence de référence du génome humain hg19. Les résultats de précision sont présentés dans le [Table 18](#).

Table 18 Accord somatique de l'échantillon GM12878 avec la base de données NIST

Échantillon	Nombre d'amplicons	Taux d'appel moyen	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Sur la base des données fournies par cette étude somatique en neuf séries, NextSeq 550Dx instrument peut systématiquement séquencer :

- Teneur en GC $\geq 19\%$ (toutes bases appelées dans 378 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 19 % ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 2,6 %)
- Teneur en GC $\leq 87\%$ (toutes bases appelées dans 378 amplicons séquencés avec une teneur en GC de 87 % ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 0,6 %)
- Longueurs de polyA ≤ 9 (toutes bases appelées dans 378 amplicons séquencés contenant une répétition de polyA de neuf nucléotides ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 2,5 %)
- Longueurs de polyT ≤ 10 (toutes bases appelées dans 378 amplicons séquencés contenant une répétition de polyT de dix nucléotides ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel inférieur à 0,1 %)
- Longueurs de polyG ≤ 6 (toutes bases appelées dans 2268 amplicons séquencés contenant une répétition de polyG de six nucléotides ont été appelées correctement avec un taux d'absence d'appel de 0,5 %)
- Longueurs de polyC ≤ 6 (toutes bases appelées dans 756 amplicons séquencés contenant une répétition de polyC de six nucléotides appelés correctement avec un taux d'absence d'appel de 0,4 %)
- Longueurs de répétition de dinucléotide $\leq 4x$ (toutes bases appelées dans 1890 amplicons séquencés contenant une répétition de dinucléotide 4x ont été appelées correctement avec un taux de non-appel de 0,9 %)
- Longueur des répétitions trinucleotidiques $\leq 5x$ (toutes bases appelées dans 378 amplicons séquencés contenant une répétition trinucleotidique 5x ont été appelées correctement avec un taux de non-appel de 1,4 %)

- Longueurs d’insertion ≤ 23 (toutes les bases appelées dans 378 amplicons séquencés contenant une insertion de 23 nucléotides ont été appelées correctement avec un taux de non-appel de 0,8 %).
- Longueurs de suppression ≤ 25 (toutes bases appelées dans 1134 amplicons séquencés contenant une délétion de 25 nucléotides ont été appelées correctement avec un taux de non-appel de 0,7 %)

Précision

La précision de NextSeq 550Dx instrument a été déterminée en testant 13 échantillons uniques de génome en platine à l’aide de trois instruments, trois lots de réactifs et trois opérateurs pour générer neuf séries de séquençage sur cinq jours de début. Le test représentatif, les échantillons et la méthode de référence sont les mêmes que ceux décrits pour l’étude de précision de la lignée germinale. Les contributions de précision ont été déterminées par l’analyse des composantes de variance en utilisant le VAF comme variable de réponse et en calculant les écarts-types au niveau des composantes pour l’instrument, le lot de réactifs, l’opérateur et le jour de début (Table 19). Le nombre total d’observations utilisées dans l’analyse pour chaque composante de la variabilité de l’instrument, de l’opérateur ou du lot de réactifs était de 699, 176 et 235 pour les SNV, les insertions et les délétions, respectivement.

Table 19 Résultats de précision pour NextSeq 550Dx instrument (écart-type)

Composante	Type de variant	Composante SD		Total SD	
		Max	Médiane	Max	Médiane
Lot	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertion	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Suppression	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
	Suppression	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
	Suppression	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
	Suppression	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Comparaison des méthodes (plateforme de séquençage)

Les échantillons de sang complet et FFPE ont été évalués sur NextSeq 550Dx instrument et MiSeqDx instrument à l’aide des flux de travail germinaux et somatiques TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. L’accord de fréquence des variants pour les échantillons de sang et FFPE a été évalué à l’aide de tests représentatifs

multiples. La Figure 2 représente la corrélation VAF entre les deux instruments pour un dosage représentatif et le Table 20 résume cette corrélation par panel de test. Sur la base de la forte corrélation entre MiSeqDx instrument et NextSeq 550Dx instrument, les caractéristiques de performance liées aux facteurs pré-analytiques (par ex., méthodes d'extraction ou substances interférentes) sont déterminées comme étant applicables aux deux instruments. Voir la notice du TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pour plus de détails.

Figure 2 Corrélation de la VAF de MiSeqDx instrument et NextSeq 550Dx instrument pour les échantillons FFPE (gauche) et sanguins (droite) à l'aide du test 1

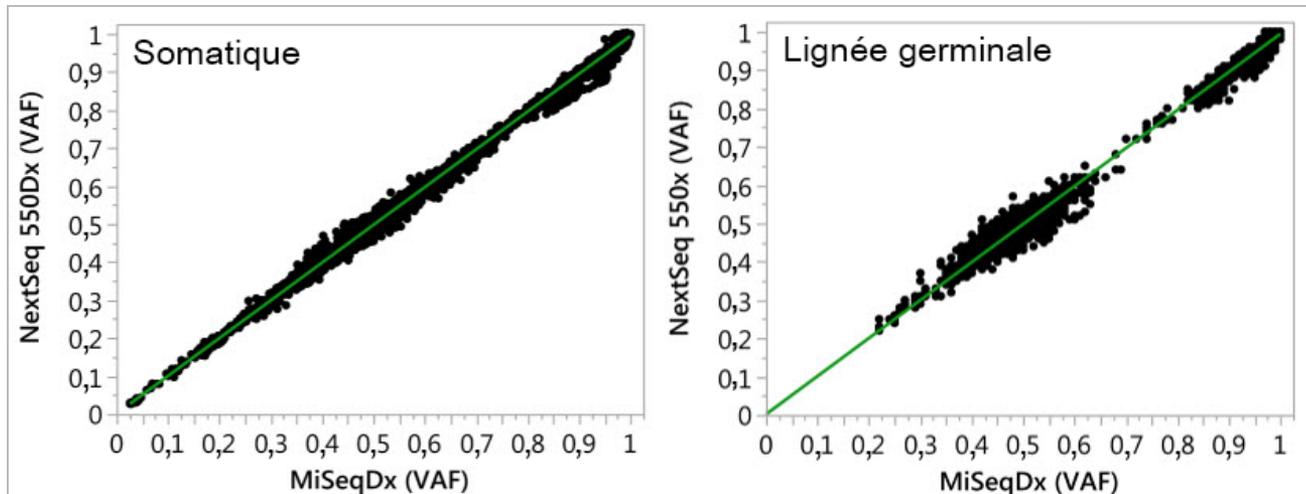


Table 20 Résultats de comparaison des méthodes utilisant des échantillons de sang et FFPE uniques

Source de l'ADNg	Test (panneau d'Oligo)	Réplicats biologiques (échantillons)	Réplicats techniques (par échantillon)	Observations (nombre de variants)	Pente	Interception	Corrélation (R ²)
Sang	Test 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Sang	Test 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Test 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Test 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Deux points de données ont été supprimés en fonction de la limitation indiquée pour le module des variants de lignée germinale.

²Coefficient de détermination pour les tracés VAF comme illustré sur la Figure 2.

Reproductibilité

La reproductibilité du NextSeq 550Dx instrument a été évaluée à l'aide d'échantillons de génome de platine avec un test représentatif conçu pour rechercher une variété de gènes couvrant 12 588 bases sur 23 chromosomes différents en utilisant 150 amplicons. Le test germinale a consisté en sept répétitions de 13 échantillons ; le test somatique a consisté en six répétitions de sept échantillons à différents niveaux de VAF. Les échantillons ont été préparés à l'aide du TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Le test a été effectué sur trois sites externes à l'aide d'un lot de kit de réactifs à haute sortie NextSeq 550Dx v2 (300 cycles). Un seul NextSeq 550Dx instrument a été utilisé sur chaque site. Deux opérateurs ont effectué les tests sur chaque site. Chaque opérateur a effectué des tests sur trois jours de début non consécutifs pour chaque type d'échantillon, pour un total de 36 séries sur les trois sites. Ce test a donné lieu à 18 séries pour chaque flux de travail germinale et somatique.

Lignée germinale

Les variants de lignée germinale avec un taux de VAF $\geq 0,2$ sont considérés comme positifs (variant). Pour les variants de lignée germinale positives attendues, les données ont été évaluées pour l'absence de taux d'appel et le taux d'appel positif correct dans chaque type de variant (SNV, insertion, suppression). Le [Table 21](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs et supérieurs à 95 % (LCL/UCL) calculés à l'aide de la méthode du score de Wilson, pour chaque type de variant.

Table 21 Observations d'appel germinatif pour les résultats positifs attendus par type de variant

Type de variant	Aucun appel			Appel positif correct				
	Observé	Total	Pourcentage	Observé	Total	Pourcentage	LCL à 95 %	UCL à 95 %
SNV	16	110,376	0,014	110,349	110,360	99,99	99,98	99,99
Insertions	1026	37,044	2,77	36,018	36,018	100	99,99	100,00
Suppressions	648	34,776	1,86	34,128	34,128	100	99,99	100,00

Les variants de lignée germinale avec un taux de VAF $< 0,2$ sont considérées comme négatives (type sauvage). Pour les emplacements germinaux négatifs attendus, les données ont été évaluées pour l'absence d'appel et les taux d'appel de type sauvage corrects. Le [Table 22](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs et supérieurs à 95 % (LCL/UCL) calculés à l'aide de la méthode du score de Wilson.

Table 22 Observations d'appel germinatif pour les résultats négatifs attendus

Type de variant	Aucun appel			Appel négatif correct				
	Observé	Total	Pourcentage	Observé	Total	Pourcentage	LCL à 95 %	UCL à 95 %
Type sauvage	4883	19,600,182	0,025	19,595,299	19,595,299	100	100,00	100,00

Les variants de lignée germinale avec un taux de VAF $\geq 0,2$ et $< 0,7$ sont appelés positifs hétérozygotes pour le variant, et les variants avec un taux de VAF $\geq 0,7$ sont appelés positifs homozygotes pour le variant. Des échantillons germinaux avec des variants hétérozygotes ont été utilisés pour déterminer si la variabilité inhérente du test affecterait l'appel du génotype. Le Cx a été déterminé pour les deux seuils (0,2 pour les génotypes hétérozygotes et 0,7 pour les génotypes homozygotes), où x est la proportion de tests répétés qui dépassent le seuil. Pour le seuil inférieur de 0,2 VAF, le Cx était $\geq 99,999$ %, ce qui indique que $\geq 99,999$ % des

variants hétérozygotes seraient appelées hétérozygotes. En ce qui concerne le seuil supérieur de 0,7 VAF, le Cx était $\leq 0,001\%$, indiquant ainsi que $\leq 0,001\%$ des variants hétérozygotes seraient appelées homozygotes. Le [Table 23](#) résume les résultats par type de variant.

Les variants de lignée germinale avec un taux de VAF $\geq 0,2$ et $< 0,7$ sont appelés positifs hétérozygotes pour le variant, et les variants avec un taux de VAF $\geq 0,7$ sont appelés positifs homozygotes pour le variant. Des échantillons germinaux avec des variants hétérozygotes ont été utilisés pour déterminer si la variabilité inhérente du test affecterait l'appel du génotype. Le Cx a été déterminé pour les deux seuils (0,2 pour les génotypes hétérozygotes et 0,7 pour les génotypes homozygotes), où x est la proportion de tests répétés qui dépassent le seuil. En ce qui concerne le seuil inférieur de 0,2 VAF, le Cx était $\geq 99,999\%$, ce qui indique que $\geq 99,999\%$ des variants hétérozygotes seraient appelées hétérozygotes. Pour le seuil supérieur de 0,7 VAF, le Cx était $\leq 0,001\%$, ce qui indique que $\leq 0,001\%$ des variants hétérozygotes seraient appelées homozygotes. Le [Table 23](#) résume les résultats par type de variant.

Table 23 Valeurs Cx germinales pour les variants hétérozygotes

Type de variant	Seuil à 0,2 VAF	Seuil à 0,7 VAF
	$\geq C99,999\%$	$\leq C0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Insertions	24/24	24/24
Suppressions	35/35	35/35
Total	153	153

Somatique

Les variants somatiques avec des taux de VAF $\geq 0,026$ sont considérés comme positifs (variant). Les observations avec des taux de VAF $\geq 0,01$ et $< 0,026$ ont été considérées comme équivoques aux fins de cette analyse (ni positives ni négatives, marquées comme une faible fréquence de variants). Pour évaluer la performance, les résultats ont été calculés de trois manières :

- Meilleur cas : Tout résultat équivoque a été considéré comme un appel positif correct (accord avec les résultats attendus)
- Pire cas : Tout résultat équivoque a été considéré comme un appel incorrect (désaccord avec les résultats attendus)
- Cas d'exclusion : Tout résultat équivoque a été exclu de l'analyse

Trois tableaux, [Table 24](#), [Table 25](#) et [Table 26](#), résument les résultats de l'appel pour le meilleur cas, le pire cas et le cas d'exclusion, respectivement, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs et supérieurs à 95 % (LCL/UCL) calculés à l'aide de la méthode du score de Wilson.

Table 24 Observations somatiques des appels pour les résultats positifs attendus par type de variant (meilleur cas)

Type de variant	Appel positif correct				
	Observé	Total	Pourcentage	LCL à 95 %	UCL à 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertions	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Suppressions	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Table 25 Observations somatiques des appels pour les résultats positifs attendus par type de variant (pire des cas)

Type de variant	Appel positif correct				
	Observé	Total	Pourcentage	LCL à 95 %	UCL à 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertions	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Suppressions	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Table 26 Observations somatiques des appels pour les résultats positifs attendus par type de variant (appels équivoques supprimés)

Type de variant	Appel positif correct				
	Observé	Total	Pourcentage	LCL à 95 %	UCL à 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertions	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Suppressions	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Les variants somatiques avec un taux de VAF < 0,01 sont considérées comme des appels négatifs (de type sauvage). Pour les emplacements somatiques négatifs attendus, les données ont été évaluées pour l'absence de taux d'appel et le taux d'appel de type sauvage correct. Les appels de type sauvage corrects ont été déterminés en excluant les appels nuls et en soustrayant les appels observés qui sont tombés dans la zone équivoque (niveaux de VAF ≥ 0,01 et < 0,026) ainsi que les appels incorrects qui étaient au-dessus du seuil (niveaux de VAF ≥ 0,026) du total. Le [Table 27](#) résume les résultats observés, totaux et en pourcentage pour les emplacements somatiques négatifs pour le taux d'absence d'appel et le taux d'appel de type sauvage correct, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs et supérieurs à 95 % (LCL/UCL) calculés à l'aide de la méthode du score de Wilson.

Table 27 Observations somatiques des appels pour les résultats négatifs attendus

Variant Type	Aucun appel			Appel correct						
	Observé	Total	Pourcentage	Équivoque	Incorrect	Correct	Total	Pourcentage	LCL à 95 %	UCL à 95 %
Type sauvage	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8,873,350	99,97	99 972	99 974

Des échantillons somatiques à différents niveaux de VAF pour la même variant ont été évalués pour déterminer le C95 du test (dans chaque type de variant). Pour évaluer la variabilité près du seuil du test, des échantillons dont les taux de VAF attendus étaient compris entre 0,02 et 0,07 ont été utilisés. Le C95 a été déterminé pour chaque variant, avec le C95 le plus élevé pour chaque type de variant rapporté dans le [Table 28](#).

Table 28 Résumé de la somatique C95

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

Performances du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)

Aperçu

Le NextSeq 550Dx est pris en charge par deux kits de réactifs : le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) et le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Pour démontrer que le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) peut répondre aux exigences de performances analytiques vérifiées et validées avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), des études ont été menées avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Deux préparations de bibliothèque utilisant le TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ont été effectuées, l'une avec le flux de travail de lignée germinale et l'autre avec le flux de travail somatique. Les bibliothèques de chaque flux de travail ont été testées avec trois lots de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) à l'aide de trois NextSeq 550Dx instruments. En outre, les tests pour chaque flux de travail comprenaient une seule série avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Sensibilité analytique (limite de blanc [LoB] et limite de détection [LoD])

La vérification avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) a démontré que NextSeq 550Dx instrument pouvait détecter des variants à 0,05 VAF avec une erreur de type II $\leq 0,05$ et que le seuil de 0,026 VAF utilisé par le module de variants somatiques (LoB effective) prend en charge une erreur de type I $\leq 0,01$. Sur la base de ces revendications, on s'attend à ce qu'un variant à 0,05 VAF soit supérieure ou égale à 0,026 VAF 95 % du temps et qu'une position de type sauvage soit inférieure à 0,026 VAF 99 % du temps. Pour s'assurer que ces revendications ont été satisfaites avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), des mesures répétées ont été effectuées sur NextSeq 550Dx instrument avec des échantillons de type sauvage (échantillons LoB) et avec des échantillons contenant des variants à 0,05 VAF (échantillons LoD) à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). La proportion d'appels au-dessus et en dessous du seuil de 0,026 a ensuite été comparée aux revendications établies avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Les tests comprenaient deux échantillons de LoD, chacun avec un ensemble unique de variants ciblés à 0,05 VAF et des échantillons de LoB correspondants de type sauvage pour les variants ciblés. Pour la préparation de la bibliothèque, les échantillons LoD et LoB ont été traités en réplicats de huit et sept, respectivement, à l'aide du TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Les bibliothèques ont été initialement séquencées à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) pour identifier les variants/coordonnées génomiques pour l'évaluation de la LoB/LoD avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Tous les variants avec un VAF moyen compris entre 0,045 et 0,055 (variants LoD) d'après les résultats du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) ont été utilisés pour l'analyse de la LoD (N = 51 variants). Pour l'analyse de la LoB, les 51 coordonnées génomiques correspondantes ont été évaluées. Pour l'évaluation du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), les bibliothèques ont été séquencées en trois séries sur trois jours consécutifs en utilisant le même lot de kits d'instruments et de réactifs. Ce test s'élevait à 24 réplicats pour chacun des 51 variants LoD et 21 réplicats pour chacune des positions de type sauvage correspondantes. La proportion d'appels de type sauvage avec un VAF < 0,026 est présentée dans le [Table 29](#). La proportion d'appels de variants LoD avec un VAF supérieur ou égal à 0,026 est présentée dans le [Table 30](#).

Table 29 Proportion d'appels < 0,026 pour les postes de type sauvage (évaluation de la revendication de la LoB)

Variant Type	Positions évaluées	Total des observations	Nombre de mesures VAF ≥ 2,6 %	Proportion < 2,6 %	Proportion 95 % Intervalle de confiance
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Insertion	11	231	0	1	0,984 – 1
Suppression	8	168	0	1	0,978 – 1

Table 30 Proportion d'appels ≥ 0,026 VAF pour les variants LoD (évaluation de la réclamation de la LoD)

Variant Type	Positions évaluées	Total des observations	Nombre de mesures VAF < 2,6 %	Nombre de mesures VAF ≥ 2,6 %	Proportion ≥ 2,6 %	Proportion 95 % Intervalle de confiance
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Insertion	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Suppression	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Précision

Lignée germinale

L'étude suivante a été menée pour évaluer la précision de l'appel de variants avec le module de variants de lignée germinale à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Douze échantillons uniques de génome en platine ont été testés à l'aide d'un test représentatif. Au total, 11 séries ont été réalisées à l'aide de trois NextSeq 550Dx instruments et de trois du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les suppressions en comparant les résultats à une méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats de précision d'une seule série de séquençage avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sont fournis à titre de référence. Un résumé des résultats est fourni dans le [Table 31](#).

Table 31 Résumé de l'accord relatif à la lignée germinale

Critères	Observations totales (v2.5) ¹	Résultat par observation (v2.5) ²	Résultat par observation (v2) ³	Résultat par exécution (v2.5) ⁴	Résultat par exécution (v2) ⁴
PPA pour SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA pour insertions	1056	100	100	100	100
PPA pour suppressions	1056	95,2	95,2	> 99,9	> 99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Calculé comme le nombre d'échantillons par série x le nombre de séries (96 échantillons par série x 11 séries = 1056 observations).

²Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon sur toutes les séries (sur la base de 11 séries pour le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon sur 1 série (96 observations au total).

⁴ Valeur la plus faible lorsque les données de chaque série sont analysées sous forme agrégée.

Somatique

L'étude suivante a été menée pour évaluer la précision de la désignation des variants du module de variants somatiques sur NextSeq 550Dx instrument à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Dix échantillons FFPE de génome en platine (deux avec des variants diluées à 0,05 VAF) ont été testés à l'aide d'un test représentatif. Au total, 11 séries ont été réalisées à l'aide de trois NextSeq 550Dx instruments et de trois lots du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les suppressions en comparant les résultats à une méthode de référence composite bien caractérisée, Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats de précision d'une seule série de séquençage avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sont fournis à titre de référence. Un résumé des résultats est fourni dans le [Table 32](#).

Table 32 Résumé de l'accord somatique

Critères	Total des observations (v2.5) ¹	Résultat par observation (v2.5) ²	Résultat par observation (v2) ³	Résultat par série (v2.5) ⁴	Résultat par série (v2) ⁴
PPA pour SNV	528	100	100	100	100
PPA pour insertions	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA pour suppressions	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Calculé comme le nombre d'échantillons par série x le nombre de séries (48 échantillons par série x 11 séries = 528 observations).

²Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon sur toutes les séries (sur la base de 11 séries pour le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Valeur observée la plus faible par réplicat d'échantillon sur 1 série (96 observations au total).

⁴Valeur la plus faible lorsque les données de chaque série sont analysées sous forme agrégée.

Précision

Lignée germinale

La précision du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) avec le module de variants de lignée germinale a été évaluée à l'aide d'échantillons de génome en platine et d'un test représentatif. Les tests consistaient en une seule préparation de bibliothèque à l'aide du TruSeq Custom Amplicon Kit Dx et comprenaient 12 échantillons traités avec huit réplicats chacun. Les bibliothèques ont été séquencées avec trois lots du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) et trois instruments NextSeq 550Dx pour un total de neuf séries de séquençage.

Des échantillons présentant des variants hétérozygotes ont été utilisés pour déterminer si la variabilité inhérente au test affecterait l'appel du génotype (N = 153 variants hétérozygotes uniques). Le Cx a été déterminé pour les deux seuils du module de variants de lignée germinale (0,2 pour les génotypes hétérozygotes et 0,7 pour les génotypes homozygotes), où x est la proportion de tests répétés qui dépassent le seuil. Pour le seuil inférieur de 0,2 VAF, le variant avec le Cx minimum pour le NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) était > 99,9 %, ce qui indique que > 99,9 % des variants hétérozygotes seraient appelés hétérozygotes. Pour le seuil supérieur de 0,7 VAF, le variant avec le Cx maximum pour le NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) était < 1,5 %, ce qui indique que ≤ 1,5 % des variants hétérozygotes seraient appelés homozygotes. Le [Table 33](#) résume les résultats par type de variant. Les valeurs Cx de la série de séquençage unique à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sont fournies à titre de référence.

Table 33 Valeurs Cx germinales pour les variants hétérozygotes

Type de variant	N	Seuil à 0,2 VAF		Seuil à 0,7 VAF	
		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 %
Suppressions	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

¹Valeurs Cx basées sur les estimations de l'écart-type total à partir de l'analyse des composantes de variance.

²Valeurs Cx basées sur des écarts types d'échantillon.

Somatique

La précision du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) avec le module de variants somatiques a été évaluée à l'aide d'échantillons FFPE de génome en platine et d'un test représentatif. Les tests consistaient en une seule préparation de bibliothèque à l'aide du TruSeq Custom Amplicon Kit Dx et comprenaient deux échantillons de huit réplicats chacun. Les bibliothèques ont été séquencées à l'aide de trois lots de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) et de trois NextSeq 550Dx instruments pour un total de neuf séries de séquençage.

Des variants somatiques avec des taux de VAF attendus $\leq 0,10$ VAF (N = 131 variants uniques) ont été utilisés pour évaluer la variabilité de l'instrument près du seuil de VAF du module de variants somatiques (les variants somatiques avec un taux de VAF $\geq 0,026$ sont appelés positifs pour le variant). Les valeurs C95 ont été déterminées pour chacune des variants somatiques. Les valeurs C95 représentent le VAF auquel la probabilité d'être supérieure au seuil du VAF du module de variants somatiques est de 95 %. Les valeurs C95 les plus élevées par type de variant sont indiquées dans le [Table 34](#). Les résultats C95 d'une seule série de séquençage à l'aide du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sont fournis à titre de référence.

Table 34 Résumé de la somatique C95

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

¹Valeurs C95 basées sur les estimations de l'écart-type total à partir de l'analyse des composantes de variance.

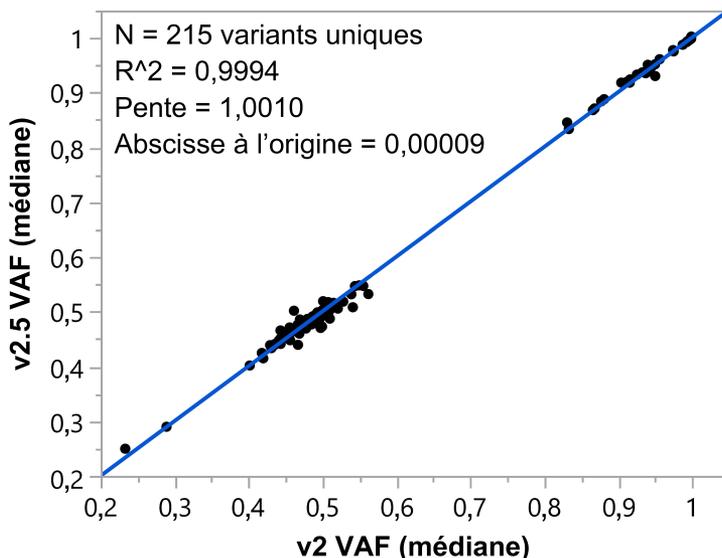
²Valeurs C95 basées sur des écarts types d'échantillon.

Comparaison des méthodes (kit réactif)

Lignée germinale

Les VAF moyens provenant de 215 variants uniques ont été évalués dans le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) et le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) à l'aide des résultats générés par le module de variants de lignée germinale. Les moyennes VAF ont été calculées à partir de 11 séries de séquençage (v2.5) et d'une série de séquençage (v2). Au moins huit répliquats ont été utilisés pour calculer la moyenne pour chaque variant. [Figure 3](#) représente la corrélation VAF entre les deux kits de réactifs. Sur la base de la forte corrélation linéaire du VAF et de la similarité des résultats entre les kits de réactifs, les caractéristiques de performance initialement vérifiées et validées avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) avec le module de variants de lignée germinale sont déterminées comme étant applicables au NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Figure 3 Corrélation de la fréquence allélique des variants (VAF) du module de variants de lignée germinale entre le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) et le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

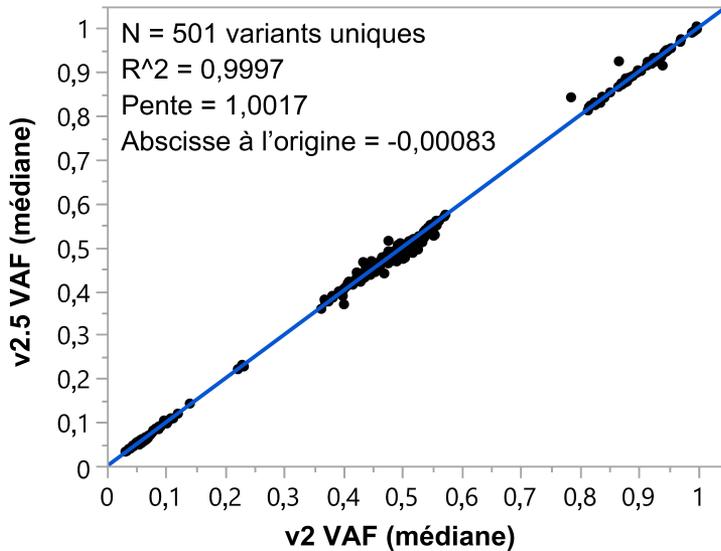


Somatique

Les VAF moyens pour 501 variants uniques ont été évalués dans le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) et le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) à l'aide des résultats générés par le module de variants somatiques. Les moyennes VAF ont été calculées à partir de 11 séries de séquençage (v2.5) et d'une série de séquençage (v2). Au moins trois répliquats ont été utilisés pour calculer la moyenne pour chaque variant unique. [Figure 4](#) représente la corrélation VAF entre les deux kits de réactifs. Sur la base de la corrélation VAF et de la similitude des résultats entre les kits de réactifs, les caractéristiques de performance

vérifiées et validées avec le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) avec le module de variants somatiques sont déterminées comme étant applicables au NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Figure 4 Corrélation de la fréquence allélique des variants (VAF) du module à variants somatiques entre le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) et le NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Historique des révisions

Document	Date	Description de modification
Document n° 1000000030326 v07	Août 2023	Ajout de contenu pour prendre en charge Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx facultatif. Mise à jour du numéro de référence du filtre à air. Mise à jour du numéro de variant FFPE (Somatique) utilisée pour déterminer les fréquences alléliques des variants. Mise à jour du tableau Résumé de l'accord relatif à la lignée germinale. Ajout d'un avertissement sur les menaces de cybersécurité.
Document n° 1000000030326 v06	Mai 2022	Mises à jour effectuées pour corriger le contenu ajouté par inadvertance à partir du logiciel source.

Document	Date	Description de modification
Document n° 1000000030326 v05	Novembre 2021	Ajout d'une déclaration d'avertissements et de précautions concernant le signalement des incidents graves. Ajout d'une déclaration aux principes de procédure spécifiant l'utilisateur prévu. Suppression de la référence au High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Ajout d'une référence au High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).
Document n° 1000000030326 v04	Août 2021	Ajout du tableau Historique des révisions. Mise à jour de l'adresse du représentant autorisé dans l'UE.

Brevets et marques déposées

Le présent document et son contenu sont la propriété d'Illumina, Inc. et de ses sociétés affiliées (« Illumina »), et sont destinés uniquement à l'utilisation contractuelle de son client en lien avec l'utilisation du ou des produit(s) décrit(s) dans les présentes et à aucune autre fin. Le présent document et son contenu ne doivent pas être utilisés ou distribués à d'autres fins et/ou autrement communiqués, divulgués ou reproduits de quelque manière que ce soit sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne concède aucune licence en vertu de ses droits de brevet, de marque commerciale, de droit d'auteur ou de common law, ni de droits similaires de tiers par le présent document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être strictement et explicitement suivies par du personnel qualifié et correctement formé afin de garantir l'utilisation correcte et sûre du ou des produit(s) décrit(s) dans ce document. Tout le contenu de ce document doit être lu et compris avant d'utiliser ce ou ces produit(s).

LE NON-RESPECT DE LA LECTURE COMPLÈTE ET DU RESPECT EXPLICITE DE TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LE PRÉSENT DOCUMENT PEUT ENTRAÎNER DES DOMMAGES AU OU AUX PRODUIT(S), DES BLESSURES AUX PERSONNES, Y COMPRIS AUX UTILISATEURS OU À D'AUTRES PERSONNES, ET DES DOMMAGES À D'AUTRES BIENS, ET ANNULERA TOUTE GARANTIE APPLICABLE AU OU AUX PRODUIT(S).

ILLUMINA N'ASSUME AUCUNE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUIT(S) DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS DES PARTIES DE CEUX-CI OU DES LOGICIELS).

© 2023 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Coordonnées



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (hors Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Étiquetage du produit

Pour une référence complète des symboles qui apparaissent sur l'emballage et l'étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles sur support.illumina.com dans l'onglet *Documentation* de votre kit.