

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx®

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

N° de référence DX-102-1001 : 6 analyses, jusqu'à 48 échantillons par trousse

Utilisation prévue

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina est un système de séquençage ciblé de diagnostic *in vitro* qui reséquence les régions de codage de protéines et les limites intron et exon du gène régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (*CFTR*) dans l'ADN génomique isolé d'échantillons de sang entier périphérique d'origine humaine prélevé dans le K₂EDTA. Le test détecte les variants à simple nucléotide et les petits indels au sein de la région séquencée, et fournit également des rapports sur deux mutations introniques profondes ainsi que deux grandes délétions. Le test est destiné à être utilisé sur l'instrument MiSeqDx d'Illumina.

Le test est destiné à être utilisé pour faciliter le diagnostic des personnes soupçonnées d'avoir la fibrose kystique (FK). Ce test est plus approprié lorsque le patient présente une fibrose kystique atypique ou non classique ou lorsque d'autres panels de mutation n'ont pas permis d'identifier les deux mutations étiologiques. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinicien diplômé ou équivalent et doivent être utilisés avec les autres renseignements cliniques et de laboratoire disponibles, y compris les symptômes cliniques, d'autres tests de diagnostic et les antécédents familiaux.

Ce test n'est pas indiqué pour être utilisé à des fins de diagnostic autonome, pour les tests de diagnostic fœtal, les tests préimplantatoires, le dépistage du porteur du gène, le dépistage néonatal ou le dépistage de population.

Résumé et explication du test

Description clinique

La fibrose kystique (FK) est l'un des troubles génétiques les plus courants du monde occidental et le trouble autosomique récessif mortel le plus répandu au sein de la population blanche non hispanique¹⁻⁵. La FK influe sur la viscosité des sécrétions de mucus et affecte l'épithélium des voies respiratoires, le pancréas, l'intestin, le système hépatobiliaire, l'appareil génital masculin et les glandes sudoripares, entraînant une maladie complexe touchant différents organes²⁻⁴; les poumons sont le premier système organique associé à la morbidité et à la mortalité⁶. Dans de nombreux cas, un trouble nutritionnel laisse présager une progression de l'atteinte des poumons liée à la FK. Un point clé des efforts d'intervention actuels est le diagnostic précoce par le biais d'un dépistage néonatal⁵. Les personnes atteintes de la maladie peuvent ainsi, grâce au diagnostic précoce, avoir accès en temps opportun à d'importants soins médicaux et profiter des meilleurs résultats possible^{2,5}. Même si le sexe influe sur les chances de survie (l'espérance de vie médiane étant plus élevée chez les hommes que chez les femmes), l'espérance de vie médiane globale est de 38,3 années aux États-Unis⁶.

Variants *CFTR* et incidence

Le gène régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (*CFTR*), identifié en 1989, est situé sur le bras long du chromosome 7 et contient 27 exons codants répartis sur 230 kb². Un ARNm de 6,5 kb produit par un allèle normal code le CFTR, une protéine intrinsèque de l'acide-amino 1 490 qui fonctionne comme un canal chlorure régulé dans les cellules épithéliales de nombreux organes^{2,3}. Plus de 1 900 variants du *CFTR* sont actuellement décrits, la majorité étant des mutations ponctuelles⁷. Le variant *CFTR* le plus courant est l'allèle F508del³ qui représente presque 70 % de tous les variants *CFTR*¹. Cependant, d'autres variants *CFTR* courants se traduisent souvent par un phénotype de fibrose kystique ou des troubles liés au *CFTR*¹⁻³.

Les estimations de l'incidence et de la prévalence de la maladie sont respectivement d'une naissance vivante sur 2 000 à 4 000 et d'environ 30 000 individus aux États-Unis². Toutes les ethnies sont touchées, à des fréquences variables : un sur 3 000 Caucasiens; un sur 9 200 Hispano-américains; un sur 10 900 Amérindiens; un sur 15 000 Afro-Américains et un sur 31 000 Asio-Américains^{2,4}. Cependant, retracer l'ethnie des individus atteints devient de plus en plus compliqué⁸. Les estimations actuelles de la fréquence d'un porteur de mutation du gène CFTR par groupe ethnique aux États-Unis, basées sur une cohorte de 364 890 individus faisant l'objet d'un test de dépistage et sans antécédents familiaux de fibrose kystique sont fournies dans le [Tableau 1](#).

Tableau 1 Fréquence générale des porteurs de la mutation de la fibrose kystique au sein de différents groupes ethniques aux États-Unis⁹

Groupe ethnique	Fréquence des porteurs observée
Afro-Américains	1 sur 84
Amérindiens	1 sur 70
Asiatique	1 sur 242
Caucasiens	1 sur 28
Hispaniques	1 sur 59
Juifs	1 sur 32
Juifs ashkénazes	1 sur 29
Moyen-Orientaux	1 sur 91
Sud-asiatiques	1 sur 118
Autre groupe ethnique	1 sur 111
Groupe ethnique > 1	1 sur 34
En partie afro-américains	1 sur 56
En partie caucasiens	1 sur 32
En partie hispaniques	1 sur 51
Non fourni	1 sur 37
Tous les individus	1 sur 38

Conception du test

Toutes les régions de codage de protéine dans le gène *CFTR*, dont 10 nt de séquence intronique adjacente, sont détectées pour tous les exons à l'exception de trois (exons 7, 10 et 20). Pour l'exon 7 et l'exon 10, seuls 5 nt de séquence intronique adjacente sont inclus à l'extrémité 5' de l'exon pour éviter des indels homopolymériques proches. Pour l'exon 20, 30 nt de séquence intronique adjacente sont inclus à l'extrémité 5' de l'exon pour activer la détection de la mutation 3272-26A > G. En outre, le test détecte également ~100 nt de séquence adjacente aux 5' UTR et 3' UTR, 2 mutations introniques profondes (1811 + 1,6kbA > G, 3 489 + 10kbC > T), 2 grandes délétions (CFTRdele2, 3, CFTRdele22, 23) et la région PolyTG/PolyT. La couverture complète du test est indiquée dans les positions des coordonnées génomiques énumérées dans le [Tableau 2](#).



REMARQUE :

Il existe des limites à la détection de délétions au niveau des emplacements génomiques spécifiques au sein des régions séquencées de ce test (voir la section [Limites de la procédure](#), page 6).

Tableau 2 Couverture des coordonnées génomiques du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

	Début des coordonnées génomiques hg19 (chr7)	Fin des coordonnées génomiques hg19 (chr7)	Longueur (paire de bases)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon2	117144297	117144427	131

	Début des coordonnées génomiques hg19 (chr7)	Fin des coordonnées génomiques hg19 (chr7)	Longueur (paire de bases)
CFTR_Exon3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7^	117176597	117176737	141
CFTR_Exon8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10^	117188690	117188887	198
CFTR_Exon11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12*	117229516	117229526	11
CFTR_Exon13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon20 [‡]	117251605	117251872	268
CFTR_Exon21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22*	117280010	117280020	11
CFTR_Exon23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon27	117306952	117307262	311
Nombre total de bases			5 203**

^ Pour l'exon 7 et l'exon 10, seuls 5 nt de séquence intronique adjacente sont inclus en amont de l'exon pour éviter les tronçons homopolymériques dans ces régions. Dans le cas de l'exon 10, il s'agit de la région PolyT/Poly TG dans l'intron 9. Cette région est traitée de manière spéciale et à part.

* Pour les mutations introniques profondes, 5 nucléotides adjacents de chaque côté des SNV sont également inclus.

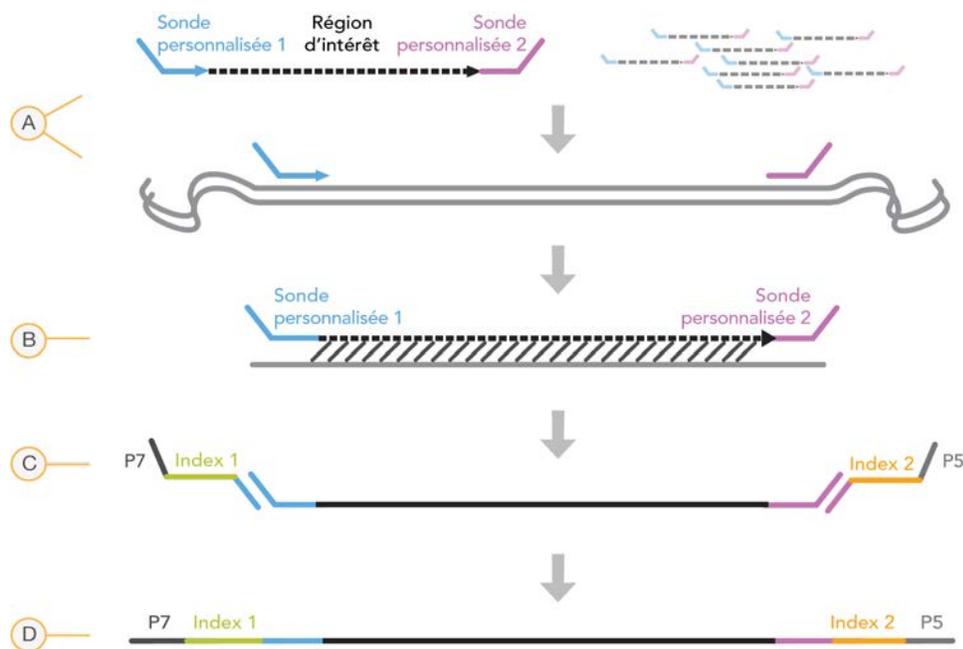
Pour l'exon 20, 30 nt de séquence intronique adjacente sont inclus à l'extrémité 5' de l'exon pour activer la détection de la mutation 3272-26A>G.

** En comptant les deux grandes délétions et les régions PolyTG/PolyT, le total des positions et de régions est de 5 206.

Principes procéduraux

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina comprend deux procédures principales. La première procédure, appelée préparation de la librairie, consiste à préparer les échantillons à séquencer. La préparation de la librairie comporte quatre étapes clés : l'hybridation, l'extension-ligation, l'amplification PCR et la normalisation des librairies. La deuxième procédure consiste à séquencer l'échantillon préparé à l'aide de la chimie SBS (séquençage par synthèse) sur l'instrument MiSeqDx.

Préparation de la librairie



- A Hybridation :** la première étape, l'hybridation, hybride un groupe d'oligonucléotides en amont et en aval spécifiques au test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx en échantillon d'ADN génomique. À la fin du procédé, une procédure de lavage en trois étapes avec un filtre capable de sélectionner la taille retire les oligonucléotides non liés de l'ADN génomique.
- B Extension-ligation :** la deuxième étape, l'extension-ligation, connecte les oligonucléotides en amont et en aval hybridés. Une ADN polymérase s'étend des oligonucléotides en amont à travers la région ciblée, suivie d'une ligation à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide en aval à l'aide d'une ADN ligase. Le résultat est la formation de produits contenant des oligonucléotides spécifiques à la FK bordés de séquences nécessaires pour l'amplification.
- C Amplification PCR :** la troisième étape, l'amplification PCR, amplifie les produits d'extension-ligation à l'aide de primers qui ajoutent les séquences d'indexage pour le multiplexage des échantillons, tout comme les adaptateurs courants nécessaires à la génération d'amplifiats sur l'instrument MiSeqDx. À la fin de ce processus, une procédure de nettoyage de PCR purifie les produits PCR (désignés comme une librairie).
- D Normalisation de librairie :** la dernière étape, la normalisation de librairie, normalise la quantité de chaque librairie pour assurer une représentation plus égale dans la dernière librairie regroupée. À la fin de ce processus, la librairie regroupée est chargée dans l'instrument MiSeqDx pour le séquençage à l'aide de la chimie SBS.

Séquençage

La chimie SBS utilise une méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter les bases à simple nucléotide à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Pendant chaque cycle de séquençage, un seul triphosphate de déoxynucléotide (dNTP) marqué par fluorescence est ajouté à la chaîne d'acide nucléique. Le marquage du nucléotide sert de terminateur pour la polymérisation. Ainsi, après chaque incorporation de dNTP, le marqueur fluorescent est imagé pour identifier la base, puis enzymatiquement clivé pour permettre l'incorporation du nucléotide suivant. Étant donné que les quatre dNTP liés à des terminateurs réversibles (A, G, T, C) sont tous présents comme molécules seules et séparées, la compétition naturelle minimise le biais lié à l'incorporation. Les définitions des bases sont effectuées directement à partir des mesures d'intensité de signal pendant chaque cycle de séquençage. Le résultat est le séquençage base par base.

Analyse des données

La première étape de l'analyse des données s'appelle l'analyse primaire. Ce processus est effectué par le logiciel d'analyse temps réel (RTA), et génère les définitions des bases et établit le score de qualité. L'étape suivante correspond à l'analyse secondaire. Les définitions des bases générées durant l'analyse primaire sont traitées afin d'obtenir des informations sur chaque échantillon. L'analyse est effectuée par le logiciel MiSeq Reporter ou Local Run Manager et comprend le démultiplexage, la génération du fichier FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF contenant des informations sur les variants trouvés à des emplacements spécifiques du génome de référence.

MiSeq Reporter et Local Run Manager sont dotés des mêmes fonctions d'analyse et de rapports sur les échantillons. La principale différence entre les deux est la méthode utilisée pour effectuer l'interface avec l'instrument MiSeqDx. Pour obtenir plus de renseignements sur les différences et pour déterminer quel logiciel est utilisé, consultez [Méthodes de l'interface de l'instrument MiSeqDx, page 6](#).

- **Démultiplexage** : si l'analyse contient plusieurs échantillons et que l'analyse présente des lectures d'index, alors le démultiplexage est la première étape dans l'analyse secondaire. Le démultiplexage sépare les données d'échantillons regroupés basées sur les index de séquence unique qui ont été ajoutés au cours de l'étape d'amplification par PCR.
- **Génération de fichiers FASTQ** : après le démultiplexage, MiSeq Reporter ou Local Run Manager génère des fichiers intermédiaires au format FASTQ, qui est un format texte utilisé pour représenter des séquences. Les fichiers FASTQ contiennent les lectures de chaque échantillon ainsi que les scores de qualité, à l'exclusion des lectures provenant de tout amplifiat n'ayant pas passé le filtre.
- **Alignement** : l'alignement compare les séquences par rapport à la référence pour déceler une relation entre les séquences et attribue un score en fonction des régions de similarité. Les lectures alignées sont écrites dans des fichiers au format BAM. Pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique, l'algorithme de Smith-Waterman par bande effectue l'alignement local des séquences pour identifier les régions similaires entre deux séquences.
- **Appel des variants** : cette étape enregistre des variants mononucléotides (SNV), des insertions et des délétions (indels), et autres variants structurels dans un fichier texte standardisé appelé MiSeqDxClinicalSequencingAssay.txt.

Pour obtenir plus de renseignements sur le flux de travail de l'analyse, consultez les guides du logiciel d'analyse installé sur votre MiSeqDx. Pour MiSeq Reporter, consultez le *Guide de référence du logiciel MiSeq Reporter (document n° 15038356)*. Pour Local Run Manager, consultez le *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (Document n° 1000000011880)* et le *Guide de flux de travail pour le module d'analyse de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager (document n° 1000000012185)*.

Méthodes de l'interface de l'instrument MiSeqDx

Il existe deux méthodes différentes pour communiquer avec l'instrument MiSeqDx dans le cadre d'un test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx. La méthode d'interface originale utilise le logiciel MiSeq Reporter ainsi que Illumina Worklist Manager (IWM) et le logiciel de gestion de l'utilisateur Illumina. La nouvelle méthode utilise le logiciel Local Run Manager.

MiSeq Reporter et Local Run Manager sont dotés des mêmes fonctions d'analyse et de rapports sur les échantillons.

Fonctions du logiciel	Originale	Nouvelle
Configurer une analyse pour l'instrument MiSeqDx	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Configuration et suivi de l'échantillon	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Contrôle de l'accès utilisateur	Logiciel de gestion de l'utilisateur Illumina	Local Run Manager
Effectuer une analyse secondaire	MiSeq Reporter	Local Run Manager
Générer les rapports	MiSeq Reporter	Local Run Manager

Suivez ces étapes pour déterminer si Local Run Manager est utilisé.

- 1 Accéder à l'instrument MiSeqDx à distance.
- 2 Connectez-vous lorsque vous y êtes invité.
- 3 Assurez-vous que « Local Run Manager » s'affiche en haut de l'écran.



REMARQUE

S'il ne vous est pas demandé de vous connecter lors d'un accès à distance à l'instrument, MiSeq Reporter est en cours d'utilisation.

Limites de la procédure

- 1 Le test séquence les régions suivantes dans le gène CFTR :
 - a Les régions de codage de protéine du gène CFTR dans 27 exons
 - b Entre 5 et 10 bases de séquence intronique adjacente
 - c Une centaine de nucléotides de séquence intronique des régions non traduites 5' et 3'
 - d Deux mutations profondes introniques (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T)
 - e La séquence PolyTG/PolyT située dans l'intron 9
 - f Un total de 5 206 positions et régions des possibles 188 702 paires de bases du gène.
- 2 Destiné au diagnostic *in vitro*. Les résultats du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina doivent être utilisés et interprétés dans le contexte d'une évaluation clinique complète.
- 3 Le test est conçu pour séquencer les régions de codage de protéine et les limites intron et exon du gène CFTR et n'inclut pas toutes les régions introniques et les grandes délétions. Ainsi, un résultat global de « type sauvage » ne garantit pas que les autres mutations ou variants du régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) ne sont pas présents dans les échantillons analysés.
 - Le test est conçu pour détecter deux grandes délétions précises, soit les CFTRdele2,3 et CFTRdele22,23. Le test ne peut pas détecter d'autres grandes délétions ni générer de rapports à ce sujet. Ce test est uniquement validé pour les insertions et délétions, jusqu'à et y compris une taille de 3 pb.
- 4 Toutes les insertions et délétions sont alignées à gauche dans les régions homopolymériques; elles seraient alignées à droite suivant la nomenclature HGVS. Par exemple, le variant c.313delA (avec le contexte de séquence GAATC) est identifié comme une délétion G-ATC, mais la délétion est signalée dans dbSNP en tant

que délétion GA-TC. Les seules exceptions sont les 135 variants de la fibrose kystique répertoriés dans le CFTR2 comme responsables de la maladie (d'après la version de la base de données en date du 04/10/2012). Tous les indels dans les régions homopolymériques au sein de cette série de variants sont rapportés comme correspondant au rapport de variants attendu selon le CFTR2¹⁰.

- 5 Le test est limité dans la détection des délétions à des emplacements génomiques spécifiques au sein des régions séquencées. Les coordonnées génomiques dont le test ne peut pas rapporter les délétions sont répertoriées dans le [Tableau 3](#). Le test ne peut pas détecter les délétions dont la ou les bases se situent dans la colonne des limites.

Tableau 3 Coordonnées génomiques où les délétions ne peuvent pas être détectées

Région du gène CFTR	Coordonnées génomiques hg19 (chr7)
CFTR_Exon1	117120041; 117120211
CFTR_Exon3	117149091
CFTR_Exon4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Exon5	117174362
CFTR_Exon6	117175417
CFTR_Exon7	117176621
CFTR_Exon8	117180176-117180177*
CFTR_Exon9	117182126
CFTR_Exon10	117188771
CFTR_Exon11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Exon12	117227802
CFTR_Exon14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Exon17	117243705; 117243843
CFTR_Exon18	117246751
CFTR_Exon19	117250688
CFTR_Exon20	117251788
CFTR_Exon22	117267721
CFTR_Exon23	117282597
CFTR_Exon24	117292953
CFTR_Exon25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Exon26	117305518
CFTR_Exon27	117307178

* Seules les délétions incluant les deux bases répertoriées ici ne peuvent pas être détectées. Par exemple, dans Exon8, seules les délétions ≥ 2 pb incluant des bases au niveau des coordonnées génomiques 117180176 et 117180177 ne peuvent pas être détectées. Une délétion de base unique à 117180176 ou 117180177 ne peut pas être détectée.

- a Si les coordonnées concernées répertoriées dans le [Tableau 3](#) sont la base située la plus à gauche d'une région homopolymérique, une délétion à n'importe quelle autre position au sein du tronçon homopolymérique ne pourra pas être détectée, parce qu'elle ne pourra pas se distinguer d'une délétion au niveau des coordonnées concernées.
- b Le test ne peut pas détecter un total de cinq variants répertoriés dans la base de données clinique ClinVar (version de la base de données consultée en décembre 2014). Ces cinq variants précis sont compris dans le [Tableau 4](#). La limite de ce test n'a aucune incidence sur les variants répertoriés dans la base de données sur la fibrose kystique, CFTR2 (version de la base de données en date du 04/10/2012).

Tableau 4 Variants connus non détectés par le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx[^]

Référence du variant	Identifiant ClinVar	Région du gène CFTR	Emplacement génomique (chr 7)	Nom d'ADNc (HGVS)	Nom de protéine (HGVS)	Identifiant rs
1	RCV000046424	CFTR_ Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_ Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_ Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_ Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profss	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_ Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

[^] Aucune donnée de fréquence n'était disponible pour les variants.

* Dans ces cas, les coordonnées concernées tombent dans une région homopolymérique.

- 6 Les variants identifiés par le biais de ce test varient en fréquence parmi les différentes populations. Il n'est pas possible de valider toutes les combinaisons de variants qui peuvent être détectées dans le gène *CFTR* à l'aide de ce test. Il est recommandé que des variants nouveaux et rares soient confirmés par l'utilisateur à l'aide d'une méthode de référence validée.
- 7 Comme avec n'importe quel test à base d'hybridation, les polymorphismes, mutations, insertions ou délétions sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et, par conséquent, les appels créés.
- 8 Pour les variants complexes où une délétion et une insertion se produisent sur le même site, le test peut rapporter cette situation comme deux variants à proximité immédiate l'un de l'autre. La mise en phase des variants n'est pas évaluée et il est impératif d'envisager d'autres solutions possibles pour la séquence détectée. Consultez le [Tableau 5](#) pour voir un exemple de variant complexe de cette nature.

Tableau 5 Variant complexe, exemple

Contexte de la séquence (référence)	GAAGAAATT
Séquence observée pour le variant	GAAT--ATT
Variant attendu	Délétion de GAA, insertion de T (les deux changements sur le même chromosome)
Variant(s) rapporté(s) par le test	SNP (G>T); Délétion de AA

- 9 Si deux variants ou plus sont identifiés dans un échantillon, il est recommandé que l'utilisateur vérifie le résultat en répétant l'échantillon à l'aide du système de l'instrument avec un nouvel extrait d'ADNg pour écarter une contamination croisée de l'échantillon.



REMARQUE

Une mise en phase de l'haplotype doit être envisagée lorsque deux variants ou plus sont détectés. Ce test ne peut pas déterminer s'il existe des variants en cis ou trans par rapport à d'autres variants.

- 10 Le test ne permet pas de déterminer si l'orientation du variant PolyTG/PolyT est en cis ou trans par rapport à d'autres variants. Pour les patients présentant un variant R117H, des tests supplémentaires doivent être effectués pour déterminer si un variant PolyTG/PolyT, pouvant affecter le phénotype clinique (p. ex., 12-13(TG) ou 5T), présente une orientation cis ou trans.

Les variants PolyTG/PolyT sont des régions homopolymériques reconnues pour être difficiles à séquencer en raison du glissement de la polymérase.

- 11 Ce test s'exécute uniquement dans un format 8-plex. Si six échantillons cliniques ne sont pas disponibles, à l'exclusion des contrôles positifs et négatifs, vous pouvez alors inclure d'autres échantillons d'ADN génomique humain pour compléter l'analyse.

Composants du produit

Le système MiSeqDx d'Illumina comprend les composants suivants :

- Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx (n° de référence DX-102-10010)
- Instrument MiSeqDx (n° de référence DX-410-1001)

Réactifs

Réactifs fournis

Illumina fournit les réactifs pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina (n° de référence DX-102-1001). Cette trousse a été configurée pour six analyses avec un maximum de huit échantillons par analyse (jusqu'à 48 échantillons au total).

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 1

Tableau 6 Boîte 1A : réactifs de préamplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tests de séquençage clinique de la fibrose kystique : pool d'oligos	1 tube	600 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides ciblant le gène <i>CFTR</i>	de -25 à -15 °C
Tampon d'hybridation	1 tube	4,32 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et du formamide	de -25 à -15 °C
Mélange extension-ligation	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un mélange exclusif d'ADN polymérases, de ligase ADN et des dNTP	de -25 à -15 °C
Primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505)	1 tube par primer	192 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	de -25 à -15 °C
Primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710)	1 tube par primer	128 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	de -25 à -15 °C
Polymérase PCR	1 tube	56 µl	ADN polymérase exclusive	de -25 à -15 °C
Mélange maître PCR	1 tube	2,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des dNTP	de -25 à -15 °C

Tableau 7 Boîte 1B : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Diluant de normalisation de librairie	1 tube	4,6 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	de -25 à -15 °C
Tampon de dilution de librairie	1 tube	4,5 ml	Solution aqueuse tamponnée	de -25 à -15 °C
Contrôle interne PhiX	1 tube	10 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant l'ADN génomique PhiX	de -25 à -15 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 2

Tableau 8 Boîte 2 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Contenu	Stockage
Cartouche de réactifs MiSeqDx - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique	6 cartouches	Cartouche à usage unique qui contient des réactifs pour la génération d'amplifiats et le séquençage aux fins d'utilisation avec l'instrument MiSeqDx ainsi que du formamide, du 2-mercaptoéthanol et < 2 % de DMSO.	de -25 à -15 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 3

Tableau 9 Boîte 3A : réactifs de préamplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon de lavage rigoureux	1 flacon	24 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	de 2 à 8 °C
Tampon de lavage universel	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	de 2 à 8 °C

Tableau 10 Boîte 3B : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Billes de nettoyage PCR	1 tube	5 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide et du polyéthylène glycol	de 2 à 8 °C
Lavage de normalisation de librairie	2 tubes	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	de 2 à 8 °C
Billes de librairie	1 tube	1,2 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	de 2 à 8 °C
Flow Cell MiSeqDx - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique	6 contenants	1 Flow Cell	Substrat en verre avec des oligonucléotides liés par covalence	de 2 à 8 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 4

Tableau 11 Boîte 4 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Solution SBS MiSeqDx (PR2) - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique	6 flacons	353,1 ml	Solution aqueuse tamponnée	de 2 à 8 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 5

Tableau 12 Boîte 5 : réactifs de préamplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Plaque filtrante	6 plaques	s.o.	Plaque de microtitration en polypropylène avec une membrane en polyéthersulfone modifiée	de 15 à 30 °C

Tableau 13 Boîte 5 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon d'éluion	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée	de 15 à 30 °C
Tampon de stockage de librairie	1 tube	3,5 ml	Solution aqueuse tamponnée	de 15 à 30 °C

Réactifs nécessaires, non fournis

Réactifs de préamplification

- 10 N de NaOH (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- Tampon TE
- Eau sans DNase ou RNase

Réactifs de post-amplification

- 10 N de NaOH (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- Éthanol 200 pour la biologie moléculaire
- Tampon TE
- Eau sans DNase ou RNase

Stockage et manipulation

- 1 La température ambiante correspond à une température de 15 °C à 30 °C.
- 2 Les réactifs suivants sont expédiés congelés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre -25 °C et -15 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.
 - Tests de séquençage clinique de la fibrose kystique : pool d'oligos
 - Tampon d'hybridation
 - Mélange extension-ligation
 - Primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505)
 - Primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710)
 - Polymérase PCR
 - Mélange maître PCR

- Diluant de normalisation de librairie
 - Tampon de dilution de librairie
 - Contrôle interne PhiX
 - Cartouche de réactifs MiSeqDx - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique
- Sauf la cartouche de réactifs, les réactifs sont stables pendant un maximum de six cycles de congélation et de décongélation qui peuvent se produire avant la date de péremption indiquée.
- Ne recongelez pas la cartouche de réactifs après qu'elle a été décongelée. Elle peut être conservée pendant un maximum de 6 heures entre 2 °C et 8 °C.
- 3 Les réactifs suivants sont expédiés réfrigérés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.
 - Tampon de lavage rigoureux
 - Tampon de lavage universel
 - Billes de nettoyage PCR
 - Billes de librairie
 - Lavage de normalisation de librairie
 - Solution SBS MiSeqDx (PR2) - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique
 - Flow Cell MiSeqDx - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique
 - 4 Les réactifs suivants sont expédiés à température ambiante et sont stables lorsqu'ils sont stockés à température ambiante jusqu'à la date de péremption indiquée.
 - Tampon d'éluion
 - Plaque filtrante
 - Tampon de stockage de librairie
 - 5 Les changements dans l'apparence physique des réactifs fournis peuvent indiquer la détérioration des matières. Si des changements dans l'apparence physique se produisent (p. ex., des changements apparents de la couleur des réactifs ou une trace de voile apparente montrant une contamination microbienne), n'utilisez pas les réactifs.
 - 6 Le tampon d'hybridation, le tampon de lavage rigoureux et les réactifs du diluant de normalisation de librairie peuvent former des précipités ou des cristaux visibles. Avant l'utilisation, secouez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis inspectez visuellement pour vous assurer qu'il n'y ait aucun précipité.
 - 7 Respectez les pratiques exemplaires suivantes lorsque vous manipulez les billes de nettoyage PCR et les billes de librairie.
 - Les billes ne doivent jamais être congelées.
 - Laissez les billes atteindre la température ambiante.
 - Immédiatement avant l'utilisation, mélangez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex jusqu'à obtenir une suspension adéquate et une couleur homogène.
 - Mélangez bien l'échantillon après que les billes ont été ajoutées en pipettant de haut en bas 10 fois. Un agitateur peut être utilisé pour bien mélanger les échantillons.
 - Incubez le mélange bille et échantillon à température ambiante pendant la durée totale indiquée.
 - Suivez les instructions lorsque vous utilisez un support magnétique. Attendez que la solution soit claire avant d'aspirer. Gardez la plaque sur le support magnétique lorsque vous aspirez doucement le surnageant, en prenant soin de ne pas déranger les billes séparées.
 - 8 La plaque d'amplification PCR peut rester sur le thermocycleur toute la nuit, ou elle peut être conservée entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de deux jours. Avant le stockage de la plaque entre 2 °C et 8 °C, scellez-la bien.
 - 9 Ne congelez pas les billes de librairie ou ne les mélangez pas avec le réactif du diluant de normalisation de librairie si ce n'est pas pour une utilisation immédiate.
 - 10 La librairie d'amplicons regroupés peut être conservée entre -25 °C et -15 °C pendant un maximum de trois jours.
 - 11 Charger Chargez le regroupement d'amplicons fraîchement dilués dans la cartouche de réactifs.

Équipement et matériel

Équipement et matériels fournis, vendus séparément

- 1 **Instrument MiSeqDx**, n° de référence DX-410-1001
- 2 **Trousse de montage de plaque d'index TruSeq**, n° de référence FC-130-1005
- 3 **Trousse de montage de plaque d'index et de collier TruSeq**, n° de référence FC-130-1007
- 4 **Bouchons de remplacement d'adaptateur d'index**, n° de référence DX-502-1003

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Équipement et matériel de préamplification

- 1 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes : vous pouvez utiliser des blocs chauffants avec couvercles chauffés.
 - Plage de température : température ambiante +5 °C à 99 °C
 - Régulation de la température : $\pm 0,1$ °C à 37 °C; $\pm 0,4$ °C à 60 °C
- 2 **Incubateur d'échantillons** : un incubateur (four à hybridation) est nécessaire. L'incubateur doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - Plage de température : de 10°C à 100°C
 - Régulation de la température : $\pm 0,2$ °C
- 3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de post-amplification). Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques qui accepte les plaques à 96 puits avec une unité de filtre atteignant les vitesses indiquées dans le protocole (de 280 à 2 400 x g).
- 4 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (Un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de post-amplification.) L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour distribuer avec précision les réactifs et les échantillons. Les pipettes monocanal ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
- 5 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
 - Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
 - Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
 - Bassin de solution, sans PVC ni DNase, ni RNase (cuve)
 - Opercule adhésif en aluminium
 - Joint de plaque PCR approprié
 - Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Équipement et matériel de postamplification

- 1 **Thermocycleur** : un thermocycleur est nécessaire. Le thermocycleur doit avoir un couvercle chauffé et respecter les spécifications de performance suivantes :
 - Plage de contrôle de la température : 4 °C à 99 °C
 - Précision du contrôle : $\pm 0,25$ °C de 35 °C à 99 °C
- 2 **Agitateur pour microplaques** : un agitateur pour microplaques est nécessaire dans la zone de postamplification du laboratoire. L'agitateur pour microplaques doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - Vitesse de mélange maximale : 3 000 tr/min
 - Plage de vitesses de mélange : 200 à 3 000 tr/min
- 3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (Une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de préamplification.) Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 x g).

- 4 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour les tubes est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
 - Régulation de température : ±0,1 °C à 37 °C; ±0,4 °C à 60 °C
- 5 **Support magnétique** : un support magnétique pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Les meilleures performances sont atteintes lorsque les aimants sont du côté du support et non au fond.
- 6 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (Un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de préamplification.) L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer d'une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes monocanal ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
- 7 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
 - Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
 - Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)



REMARQUE

Assurez-vous que la plaque à 96 puits s'adapte parfaitement au support magnétique.

- Tubes coniques, 15 mL
- Tubes de microcentrifugeuse Eppendorf (bouchon vissé recommandé)
- Barrettes de huit tubes PCR
- Bassins de solution, sans PVC ni ADNase/ARNase (cuve)
- Opercules adhésifs en aluminium
- Joints de plaque à usage unique
- Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Prélèvement, transport et stockage des échantillons



REMARQUE

Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.

- 1 Les échantillons de sang entier recueillis dans les tubes K₂EDTA peuvent être utilisés.
- 2 Les échantillons de sang entier peuvent être stockés pendant un maximum de sept jours à température ambiante, jusqu'à 30 jours entre 2 °C et 8 °C ou jusqu'à 30 jours entre -25 °C et -15 °C.
- 3 Transportez le sang entier pendant un maximum de sept jours à température ambiante, 30 jours entre 2 °C et 8 °C, ou 30 jours si congelé entre -25 °C et -15 °C. Le transport de sang entier doit être conforme aux règlements nationaux, fédéraux, régionaux et locaux sur le transport d'agents étiologiques.
- 4 Aucun effet négatif sur les performances du test n'a été observé lorsque l'ADN génomique a été soumis à six cycles de congélation et de décongélation.
- 5 Aucun effet négatif sur les performances du test n'a été observé sur les échantillons de sang entier contenant un taux élevé de bilirubine, de cholestérol, de triglycéride, d'ETDA ou d'hémoglobine.

Avertissements et précautions



ATTENTION

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

- 1 **Certains composants du test contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur.** Pour obtenir des renseignements

- sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique à l'adresse support.illumina.com/sds.html. (Voir [Réactifs, page 9](#) pour obtenir de plus amples renseignements.)
- 2 Certains composants de ce test contiennent du 2-mercaptoéthanol, un agent réducteur. (Consultez la section [Réactifs, page 9](#) pour de plus amples renseignements.) Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée et mettez au rebut les conteneurs et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour plus de renseignements, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
 - 3 Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.
 - 4 Le non-respect des procédures décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
 - 5 Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs du test. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs du test.
 - 6 N'utilisez aucun composant du test au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du carton du test. N'interchangez pas les composants du test venant de lots de test différents. Notez que les lots de test sont indiqués sur l'étiquette du carton du test.
 - 7 Conservez les composants du test à la température spécifiée dans les zones de préamplification et de post-amplification indiquées.
 - 8 Des cycles de congélation/décongélation répétés (jusqu'à six) des composants de la boîte 1 ne compromettent pas l'intégrité du test.
 - 9 Pour empêcher la dégradation des échantillons ou des réactifs, veillez à ce que toutes les vapeurs d'hypochlorite de sodium se dissipent avant de commencer le protocole.
 - 10 Les pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène dans le laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination par des produits PCR peut causer des résultats erronés et non fiables.
 - 11 Pour éviter la contamination, veillez à ce que les zones de préamplification et de post-amplification aient un équipement réservé (p. ex. pipettes, pointes de pipette, agitateur vortex et centrifugeuse).
 - 12 Évitez la contamination croisée. Utilisez de nouvelles pointes de pipette entre les échantillons et entre les réactifs distribués. Mélangez les échantillons à l'aide d'une pipette et centrifugez la plaque lorsque cela est indiqué. N'agitez pas les plaques. L'utilisation des pointes résistantes à l'aérosol réduit le risque de rétention d'amplicons et de contamination croisée d'un échantillon à l'autre.
 - 13 Une paire index-échantillon doit correspondre exactement à la feuille d'échantillons. Les inadéquations entre la feuille d'échantillons et le schéma de la plaque entraîneront une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats erroné.
 - 14 Préparez toujours une nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau présente dans l'air, ce qui affecte les résultats.
 - 15 Veillez à ce que tout l'éthanol soit retiré du bas des puits pendant les étapes de lavage. Des résidus d'éthanol pourraient affecter les résultats.
 - 16 Respectez le temps de séchage indiqué après l'étape du support magnétique pour assurer une évaporation totale. L'éthanol résiduel peut modifier les performances des réactions ultérieures.
 - 17 Ne mélangez pas le pool d'oligos du test de séquençage clinique de la fibrose kystique et les tampons d'hybridation pour le stockage. Lorsqu'ils sont mélangés, les pools d'oligos du test de séquençage clinique de la fibrose kystique deviennent instables même s'ils sont entreposés congelés.
 - 18 L'utilisation des thermocycleurs à refroidissement actif (p. ex, le refroidissement thermoélectrique, Peltier) n'est pas recommandée pour l'étape d'hybridation. L'étape de refroidissement passif est essentielle pour une hybridation adéquate.
 - 19 Ajoutez toujours la polymérase PCR au mélange maître PCR juste avant l'utilisation. Ne conservez jamais la solution de travail combinée.

- 20 Durant l'étape de normalisation de la librairie, il est extrêmement important de remettre en suspension complètement le culot des billes de la librairie. Cette étape est essentielle pour obtenir une densité uniforme des amplifiats sur la Flow Cell MiSeqDx.
- 21 Respectez les temps d'incubation indiqués dans l'étape de normalisation de la librairie. Une incubation inappropriée peut affecter la représentation de la librairie et la densité des amplifiats.
- 22 En raison du nombre de transferts de plaque et du risque subséquent de contamination, faites preuve d'extrême prudence pour vous assurer que le contenu du puits reste entièrement dans le puits. N'éclaboussez pas le contenu.
- 23 La recommandation de 250 ng en matière d'entrée d'ADN permet de varier la quantité d'ADN; les performances des tests dépendent de ce niveau d'entrée.

Acronymes

Tableau 14 Acronymes pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina

Acronyme	Définition
AMP	Plaque d'amplification
CLP	Plaque de nettoyage
DAL	Librairie d'amplicons dilués
FPU	Unité de plaque filtrante
HYB	Plaque d'hybridation
LNP	Plaque de normalisation de librairie
NTC	Contrôle négatif
PAL	Librairie d'ensembles d'amplicons
SGP	Plaque de stockage

Notes procédurales

- 1 Illumina exige qu'un échantillon d'ADN à contrôle positif et un échantillon à contrôle négatif (NTC ou contrôle sans modèle) soient inclus dans chaque analyse qui est définie comme une série d'échantillons traités en parallèle. L'échantillon d'ADN de contrôle positif devrait être un échantillon correctement caractérisé présentant un ou plusieurs variants *CFTR* connus. Illumina recommande l'utilisation d'un contrôle de type sauvage. Le contrôle de type sauvage doit être exécuté comme un échantillon et ne doit pas remplacer le contrôle positif ou négatif.
- 2 Avant de commencer le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, il faut extraire l'ADN et la quantifier.
- 3 Toute méthode d'extraction d'ADN validée peut être utilisée.
- 4 Quantifiez l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Vérifiez que l'A260/A280 de l'échantillon d'ADN est > 1,5. Normalisez l'échantillon d'ADN à 50 ng/µl. Chaque échantillon exige 5 µl d'ADN génomique (total de 250 ng).

Débit d'échantillons et représentation d'index

Le débit des échantillons du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina est de huit échantillons par analyse. Les primers d'indexage utilisés pendant l'amplification par PCR doivent être choisis en fonction du débit d'échantillons final souhaité pour assurer la diversité dans la séquence d'indexage.

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

Utilisez le jeu d'index d'équilibre des couleurs minimal suivant pour les analyses de séquençage de huit échantillons :

Tableau 15 Mélanges de primers d'index pour des analyses de séquençage avec 8 échantillons

	Primer d'index 1 (A701)	Primer d'index 2 (A702)	Primer d'index 10 (A710)
Primer d'index C (A503)	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Primer d'index D (A504)	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6
Primer d'index E (A505)	Échantillon 7	Échantillon 8	--

Si six échantillons uniques (à l'exclusion des contrôles positifs et négatifs) ne sont pas disponibles, il convient d'effectuer l'analyse avec les répliques de n'importe quel échantillon d'ADN génomique humain.

Mode d'emploi

Saisir les informations d'analyse

Vous pouvez utiliser le logiciel MiSeq Reporter ou Local Run Manager pour configurer un test de séquençage clinique de la fibrose kystique.

Si vous utilisez le logiciel MiSeq Reporter, utilisez Illumina Worklist Manager pour générer une feuille d'échantillons.

Si vous utilisez le logiciel Local Run Manager, il n'existe pas de feuille d'échantillons distincte. Saisissez les informations de configuration de l'analyse et des échantillons directement dans le module d'analyse de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager.

Pour obtenir plus de renseignements sur les différences entre MiSeq Reporter et Local Run Manager, consultez [Méthodes de l'interface de l'instrument MiSeqDx, page 6](#).

Utilisation d'Illumina Worklist Manager (IWM)

Préparation de la feuille d'échantillons MiSeqDx

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

Saisie des renseignements sur l'échantillon

- 1 Dans l'onglet Table (Tableau) ou l'onglet Plate (Plaque), saisissez les renseignements suivants pour chaque puits d'échantillon :
 - a **Sample ID** (Identifiant de l'échantillon) : saisissez un identifiant d'échantillon distinct.
 - b **Index 1 et Index 2** : précisez l'adaptateur d'index qui sera utilisé pour chaque lecture d'index.
- 2 [Facultatif] Pour enregistrer des renseignements plus détaillés sur les échantillons, saisissez un nom et une description.
- 3 [Facultatif] Pour identifier des contrôles sur la plaque, sélectionnez Negative (Négatif) ou Positive (Positif) dans le menu déroulant **Control** (Contrôle).
- 4 Accédez à l'onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque) et utilisez les options **Copy to Clipboard** (Copier dans le bloc-notes) ou **Print** (Imprimer) pour capturer une image de la plaque d'échantillon.
- 5 Sélectionnez **Finish** (Terminer). Lorsque vous enregistrez une feuille d'échantillons, le logiciel crée automatiquement un fichier .csv et un fichier .png de l'onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque) et les enregistre au même emplacement pour être utilisés avec la configuration de l'expérience.



REMARQUE

Utilisez uniquement le Worklist Manager d'Illumina pour modifier les renseignements dans la feuille d'échantillons. La modification des renseignements hors de Worklist Manager peut entraîner l'échec de l'analyse.

Utilisation du module d'analyse de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager.

Définir les paramètres

- 1 Connectez-vous à Local Run Manager.
- 2 Cliquez sur **Create Run** (Créer une analyse) puis sélectionnez **CF Clinical** (Analyse clinique de la fibrose kystique).
- 3 Saisissez un nom d'analyse qui la distinguera du séquençage jusqu'à l'analyse.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
- 4 [Facultatif] Saisissez une description pour identifier l'analyse.
Utilisez des caractères alphanumériques.

Indiquer des échantillons pour l'analyse

Indiquez des échantillons pour l'analyse à l'aide des solutions suivantes :

- **Saisie manuelle des échantillons** : utilisez le tableau vide sur l'écran Create Run (Créer une analyse). Les puits d'échantillons suggérés sont mis en surbrillance.
- **Importation des échantillons** : naviguez vers un fichier de valeurs séparées par des virgules (*.csv) externe. Il est possible d'en télécharger un modèle sur l'écran Create Run (Créer une analyse).

Saisir les échantillons manuellement

- 1 Saisissez un nom d'échantillon unique dans le champ Sample Name (Nom de l'échantillon).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des traits de soulignement.
- 2 Cliquez avec le bouton droit et sélectionnez les échantillons de contrôle positifs ou négatifs.
- 3 [Facultatif] Saisissez une description de l'échantillon dans l'onglet Sample Description (Description de l'échantillon).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets, des traits de soulignement ou des espaces.
- 4 [Facultatif] Sélectionnez un adaptateur d'index 1 dans la liste déroulante Index 1 (i7).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 qui remplissent automatiquement les puits sont déjà conformes aux exigences de diversité des index.

- 5 [Facultatif] Sélectionnez un adaptateur d'index 2 dans la liste déroulante Index 2 (i5). Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 qui remplissent automatiquement les puits sont déjà conformes aux exigences de diversité des index.
- 6 Cliquez sur l'icône  **Imprimer** pour afficher la disposition de la plaque.
- 7 Sélectionnez **Imprimer** pour imprimer la disposition de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques.
- 8 [Facultatif] Cliquez sur **Export** (Exporter) pour exporter les informations de l'échantillon vers un fichier externe.
- 9 Cliquez sur **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Importer les échantillons

- 1 Cliquez sur **Import Samples** (Importer des échantillons) et naviguez jusqu'à l'emplacement du fichier contenant les informations des échantillons. Il est possible d'importer deux types de fichiers.
 - Cliquez sur **Template** (Modèle) pour créer une nouvelle disposition de plaque. Le fichier de modèle contient les en-têtes de colonnes corrects pour l'importation. Saisissez les informations des échantillons de l'analyse dans chaque colonne. Supprimez les informations d'exemple dans les cellules non utilisées, puis enregistrez le fichier.
 - Utilisez un fichier d'informations d'échantillon préalablement exporté en utilisant la fonction Export (Exporter) du module d'analyse de flux de travail.
- 2 Cliquez sur l'icône  **Imprimer** pour afficher la disposition de la plaque.
- 3 Sélectionnez **Imprimer** pour imprimer la disposition de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques.
- 4 Cliquez sur **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Hybridation du pool d'oligonucléotides

Préparation

- 1 Amenez le pool d'oligos du test de séquençage clinique de la fibrose kystique, le tampon d'hybridation, les échantillons d'ADN génomique et l'échantillon de contrôle positif à la température ambiante.
- 2 Agitez vigoureusement le pool d'oligos du test de séquençage clinique de la fibrose kystique et le tampon d'hybridation pour veiller à ce que tous les précipités soient complètement dissouts, puis centrifugez brièvement les tubes pour recueillir le liquide.
- 3 Réglez un bloc chauffant de 96 puits à 95 °C.
- 4 Préchauffez un incubateur à 37 °C.
- 5 Créez la plaque d'échantillon en fonction du graphique de la plaque imprimé à partir d'Illumina Worklist Manager ou Local Run Manager.

Procédure

- 1 Préparez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **HYB**).
- 2 Ajoutez 5 µl d'échantillon ou de contrôle aux 50 ng/µl (250 ng total) dans les puits appropriés dans la plaque **HYB**. Suivez la disposition de la plaque générée pour une sélection appropriée des puits.
- 3 Ajouter 5 µl du test de séquençage clinique de la fibrose kystique (pool d'oligos) à tous les puits d'échantillons.
- 4 Ajoutez 40 µl de tampon d'hybridation à chaque échantillon sur la plaque **HYB**. Pipettez doucement vers le haut et le bas trois à cinq fois pour mélanger.
- 5 Scellez la plaque **HYB** et centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 6 Placez la plaque **HYB** dans le bloc préchauffé à 95 °C et laissez-la incuber pendant une minute.

- 7 Réduisez le bloc chauffant à 40 °C et continuez à incuber jusqu'à ce que le bloc chauffant atteigne 40 °C (environ 80 minutes).

Le refroidissement progressif est très important pour une bonne hybridation; par conséquent, les thermocycleurs PCR avec refroidissement actif (p. ex., Peltier avec refroidissement thermoélectrique) ne sont pas recommandés pour ce procédé.



POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Après que le bloc chauffant a atteint 40 °C, la plaque **HYB** est stable lorsqu'elle est maintenue à 40 °C pendant deux heures.

Retrait des oligonucléotides non liés

Préparation

- 1 Amenez le mélange extension-ligation, le tampon de lavage rigoureux et le tampon de lavage universel à la température ambiante et agitez brièvement.
- 2 Assemblez l'unité d'assemblage de la plaque filtrante (ci-après désignée comme la plaque **FPU**) dans l'ordre suivant de haut en bas : couvercle, plaque filtrante, collier d'adaptateur et plaque **MIDI**.
- 3 Lavez au préalable la membrane de la plaque filtrante comme suit :
 - a Ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux dans chaque puits.
 - b Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 x g à 20 °C pendant cinq minutes.



REMARQUE

Assurez-vous que tous les puits de la plaque filtrante se vident complètement. Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore à 2 400 x g à 20 °C jusqu'à ce que tout le liquide ait disparu (cinq à dix minutes supplémentaires).



ATTENTION

Il est impératif de contrôler la température de la centrifugeuse durant les étapes de lavage. Si la température grimpe à 25 °C ou plus, la température élevée pourrait augmenter la stringence de la fixation des primers. Dans de rares cas, si les échantillons comportent des SNV dans les régions de fixation des primers, la stringence élevée pourrait entraîner l'absence d'amplification des allèles.

Procédure

- 1 Retirez la plaque **HYB** du bloc chauffant et centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 2 Transférez le volume total (environ 55 µl) de chaque échantillon aux puits correspondants de la plaque filtrante.
- 3 Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 x g à 20 °C pendant cinq minutes.
- 4 Lavez la plaque filtrante comme suit :
 - a Ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux dans chaque puits d'échantillon.
 - b Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 x g à 20 °C pendant cinq minutes.
- 5 Répétez le lavage comme décrit à l'étape précédente.



REMARQUE

Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore à 2 400 x g à 20 °C jusqu'à la disparition complète du liquide (5 à 10 minutes supplémentaires).

- 6 Jetez tout liquide circulant (contenant du formamide), puis réassemblez la **FPU**.
- 7 Ajoutez 45 µl de tampon de lavage universel dans chaque puits d'échantillon.
- 8 Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 x g à 20 °C pendant 10 minutes.



REMARQUE

Veillez à ce que tout liquide soit vidé après la centrifugation. Répétez la centrifugation si nécessaire.

Extension-ligation des oligonucléotides liés

Procédure

- 1 Ajoutez 45 µl de mélange extension-ligation à chaque puits d'échantillon sur la plaque filtrante.
- 2 Scellez la plaque filtrante avec une feuille d'aluminium adhésive, puis couvrez-la avec le couvercle.
- 3 Incubez pendant 45 minutes la plaque **FPU** dans l'incubateur préchauffé à 37 °C.
- 4 Pendant que la plaque du **FPU** est en incubation, préparez l'AMP (plaque d'amplification) comme décrit dans la section suivante.

Amplification PCR

Préparation

- 1 Préparez une nouvelle solution de NaOH de 0,05 N.
- 2 Déterminez les primers d'index à utiliser selon le graphique de plaque imprimé à partir d'Illumina Worklist Manager ou de Local Run Manager.
- 3 Amenez le mélange maître PCR et les primers d'index concernés à la température ambiante. Mélangez chaque tube décongelé, puis centrifugez brièvement les tubes.
- 4 Préparez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **AMP**).
- 5 Ajoutez des primers d'index à la plaque **AMP** en fonction de la feuille d'échantillons comme suit :
 - a Ajoutez 4 µl des primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505) aux puits appropriés dans une colonne de la plaque **AMP**.
 - b Mettez au rebut les bouchons blancs d'origine et utilisez des bouchons blancs neufs.
 - c Ajoutez 4 µl des primers d'index sélectionnés 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710) aux puits appropriés dans une rangée de la plaque **AMP**. *Les extrémités doivent être changées après chaque rangée pour éviter la contamination croisée des index.*
 - d Mettez au rebut les bouchons orange d'origine et utilisez des bouchons orange neufs.
- 6 Préparez la solution de travail PCR composée du mélange maître PCR et de la polymérase PCR comme suit :
 - a Centrifugez brièvement le tube de polymérase PCR avant utilisation pour retirer les bulles d'air.
 - b Ajoutez 5,6 µl de polymérase PCR aux 280 µl du mélange maître PCR.
 - c Retournez 20 fois la solution de travail PCR préparée pour la mélanger.

Procédure

- 1 Retirez la plaque **FPU** de l'incubateur, puis enlevez l'opercule en aluminium.
- 2 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 x g à 20 °C pendant 2 minutes.
- 3 Ajoutez 25 µl de 0,05 N de NaOH à chaque puits d'échantillon sur la plaque filtrante. Pipettez la solution de NaOH de haut en bas cinq à six fois.
- 4 Recouvrez et incubez la plaque filtrante à température ambiante pendant 5 minutes.
- 5 Pendant que la plaque filtrante est en incubation, transférez 22 µl de la solution de travail PCR à chaque puits de la plaque **AMP** contenant des primers d'index.
- 6 Transférez les échantillons élués du filtre à la plaque **AMP** comme suit :
 - a Pipettez les échantillons de la première colonne de la plaque filtrante de haut en bas cinq à six fois.
 - b Transférez 20 µl de la plaque filtrante à la colonne correspondante de la plaque **AMP**.
 - c Pipettez doucement de haut en bas cinq à six fois pour combiner soigneusement l'ADN à la solution de travail PCR.
 - d Transférez les autres colonnes de la plaque filtrante à la plaque **AMP** en procédant de la même manière. *Les extrémités doivent être changées après chaque colonne pour éviter la contamination croisée de l'index et de l'échantillon.*
- 7 Scellez la plaque **AMP** et fixez-la avec un rouleau en caoutchouc.
- 8 Centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant 1 minute.
- 9 Transférez la plaque **AMP** vers la zone de post-amplification.

- 10 Réalisez la PCR en utilisant le programme suivant sur un thermocycleur :
 - 95 °C pendant 3 minutes
 - 25 cycles de :
 - 95 °C pendant 30 secondes
 - 62°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant 60 secondes
 - 72 °C pendant 5 minutes
 - Maintenez à 10 °C



POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous ne procédez pas immédiatement au nettoyage PCR, la plaque **AMP** peut rester sur le thermocycleur durant la nuit ou peut être stockée entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 48 heures.

Nettoyage PCR

Préparation

- 1 Amenez les billes de nettoyage PCR à température ambiante
- 2 Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % à partir de l'éthanol absolu.

Procédure

- 1 Centrifugez la plaque AMP à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 2 Préparez une nouvelle plaque MIDI (ci-après désignée comme la plaque **CLP**).
- 3 Renversez les billes de nettoyage PCR 10 fois. Mélangez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis retournez 10 fois de plus. Inspectez visuellement la solution pour vous assurer que les billes sont remises en suspension.
- 4 Ajoutez 45 µl de billes de nettoyage PCR dans chaque puits de la plaque **CLP**.
- 5 Transférez la totalité du produit PCR de la plaque AMP à la plaque **CLP**.
- 6 Scellez la plaque **CLP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant deux minutes.
- 7 Incubez à température ambiante sans secouer pendant 10 minutes.
- 8 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
- 9 Pendant que la plaque **CLP** est sur le support magnétique, retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
- 10 Pendant que la plaque **CLP** est sur le support magnétique, lavez les billes comme suit :
 - a Ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % fraîchement préparé dans chaque puits d'échantillon.
 - b Placez la plaque sur le support magnétique pendant 30 secondes ou jusqu'à ce que le surnageant soit éliminé.
 - c Retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
- 11 Répétez le lavage comme décrit à l'étape précédente.
- 12 Utilisez une pipette multicanal P20 réglée à 20 µl pour retirer l'excès d'alcool éthylique.
- 13 Retirez la plaque **CLP** du support magnétique et séchez les billes à l'air libre pendant 10 minutes.
- 14 Ajoutez 30 µl de tampon d'éluion dans chaque échantillon.
- 15 Scellez la plaque **CLP** et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant deux minutes. Après l'avoir secouée, vérifiez si les échantillons ont été remis en suspension. Dans le cas contraire, répétez cette étape.
- 16 Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
- 17 Placez la plaque **CLP** sur le support magnétique pendant au moins deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
- 18 Préparez une nouvelle plaque MIDI (ci-après désignée comme la plaque **LNP**).
- 19 Transférez 20 µl de surnageant de la plaque **CLP** à la plaque **LNP**.

- 20 **[Facultatif]** Transférez les 10 µl restants de surnageant de la plaque **CLP** à la nouvelle plaque et étiquetez la plaque avec un nom et une date d'analyse. Conservez cette plaque entre -25 °C et -15 °C jusqu'à la fin de l'analyse de séquençage et de l'analyse de données. Les produits PCR nettoyés peuvent être utilisés pour des efforts de dépannage en cas de pannes d'échantillon.



POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez à ce point, scellez la plaque **LNP** et centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute. La plaque est stable pendant une durée maximale de 3 heures entre 2 °C et 8 °C.

Normalisation des librairies

Préparation

- 1 Préparez une nouvelle solution de NaOH de 0,1 N en ajoutant 30 µl de NaOH de 10 N à 2970 µl d'eau sans DNase ni RNase.
- 2 Amenez le diluant de normalisation de librairie, les billes de librairie et le lavage de normalisation de librairie à la température ambiante.
- 3 Agitez vigoureusement le diluant de normalisation de librairie et veillez à ce que tous les précipités soient dissouts.
- 4 Mélangez vigoureusement les billes de librairie pendant une minute avec inversion intermittente jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension et qu'aucun culot ne se trouve au fond du tube lorsque celui-ci est retourné.

Procédure

- 1 Mélangez le diluant de normalisation de librairie et les billes de librairie dans un nouveau tube de 1,5 ml comme suit :
 - a Ajoutez 394 µl de diluant de normalisation de librairie.
 - b Pipettez les billes de librairie de haut en bas 10 fois pour les remettre en suspension.
- 2 Ajoutez 45 µl de la solution de travail combinée de diluant de normalisation de librairie et de billes de librairie dans chacun des puits de la plaque **LNP** qui contient les librairies.
- 3 Scellez la plaque **LNP** et secouez-la sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.



REMARQUE

Il est extrêmement important de remettre entièrement en suspension le culot de billes de la librairie au fond du tube. L'utilisation d'un P1000 permet de s'assurer que les billes sont resuspendues de manière homogène et qu'il n'y a aucune masse de billes au fond du tube. Cette étape est essentielle pour obtenir une densité uniforme des amplifiats sur la Flow Cell.

- c Pipettez 72 µl de billes de librairie dans le tube qui contient le diluant de normalisation de librairie.
 - d Mélangez en retournant le tube 15 à 20 fois.
- 4 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
- 5 Pendant que la plaque **LNP** est sur le support magnétique, retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
- 6 Retirez la plaque **LNP** du support magnétique et lavez les billes avec le lavage de normalisation de librairie comme suit :
 - a Ajoutez 45 µl de lavage de normalisation de librairie dans chacun des puits d'échantillon.
 - b Scellez la plaque **LNP** et secouez-la sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant cinq minutes.
 - c Placez la plaque sur le support magnétique pendant au moins deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
 - d Retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.

- 7 Répétez la procédure de lavage de normalisation de librairie comme décrit à l'étape précédente.
- 8 Utilisez une pipette multicanal P20 réglée à 20 µl pour retirer l'excès de lavage de normalisation de librairie.
- 9 Retirez la plaque **LNP** du support magnétique et ajoutez 30 µl de NaOH de 0,1 N dans chacun des puits.
- 10 Scellez la plaque **LNP** et secouez-la sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant cinq minutes.
- 11 Pendant l'élution de 5 minutes, prévoyez une nouvelle plaque PCR à 96 puits (ci-après dénommée la plaque **SGP**).
- 12 Ajoutez 30 µl de tampon de stockage de librairie dans chaque puits qui sera utilisé dans la plaque **SGP**.
- 13 Après l'élution de cinq minutes, assurez-vous que tous les échantillons de la plaque **LNP** sont complètement remis en suspension. Si les échantillons ne sont pas complètement remis en suspension, pipettez doucement ces échantillons de haut en bas ou tapotez doucement la plaque sur la paillasse pour remettre les billes en suspension, puis secouez-la pendant encore cinq minutes.
- 14 Placez la plaque **LNP** sur le support magnétique pendant au moins deux minutes.
- 15 Transférez le surnageant de la plaque **LNP** à la plaque **SGP**. Pipettez doucement de haut en bas cinq fois pour mélanger.
- 16 Scellez la plaque **SGP** et centrifugez-la à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute.



POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous ne procédez pas immédiatement au groupement des librairies ni au séquençage ultérieur sur l'instrument MiSeqDx, stockez la plaque **SGP** à une température comprise entre -25 et -15 °C pendant trois jours au maximum.

Regroupement de librairies

Préparer le regroupement de librairies

- 1 Réglez sur 96 °C un bloc chauffant adapté aux tubes de centrifugeuse de 1,5 ml.
- 2 Dans un seau à glace, préparez un bain d'eau glacée. Faites refroidir le tampon de dilution de librairie dans le bain d'eau glacée.
- 3 Commencez à décongeler la cartouche de réactifs de l'instrument MiSeqDx.

Préparation de la cartouche de réactifs

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

Inspection de la cartouche de réactifs

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



REMARQUE

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

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



REMARQUE

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

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

Dénaturation et dilution du contrôle interne PhiX

- Préparez la solution de NaOH 0,1 N en combinant les volumes suivants dans un tube conique :
 - Eau sans RNase/DNase (2 475 µl)
 - Stock de NaOH 10 N (25 µl)
- Retournez le tube plusieurs fois pour mélanger.



ATTENTION

L'utilisation de NaOH fraîchement dilué est essentielle pour dénaturer complètement les échantillons pour la génération d'amplifiats sur le système MiSeqDx.



REMARQUE

Si le contrôle PhiX est préparé le même jour que la normalisation de librairie, vous pouvez utiliser le même stock de NaOH 0,1 N.

- Combinez les volumes suivants pour diluer la librairie de contrôle interne PhiX de 2 nmol :
 - Librairie de contrôle interne PhiX 10 nmol (2 µl)
 - Tampon 1X TE (8 µl)
- Combinez les volumes suivants pour obtenir une librairie de contrôle interne PhiX 1 nmol :
 - Librairie de contrôle interne PhiX 2 nmol (10 µl)
 - NaOH 0,1 N (10 µl)
- Agitez brièvement la solution de la librairie de contrôle interne PhiX de 1 nmol.
- Centrifugez le contrôle interne PhiX de 1 nmol à 280 x g à 20 °C pendant une minute.
- Incubez pendant 5 minutes à température ambiante pour dénaturer la solution de la librairie de contrôle interne PhiX en brins uniques.
- Combinez les volumes suivants dans un nouveau microtube à centrifuger afin d'obtenir une librairie de contrôle interne PhiX de 20 pmol :
 - Librairie de contrôle interne PhiX dénaturée (2 µl)
 - Tampon de dilution de librairie préalablement réfrigéré (98 µl)



REMARQUE

La librairie de contrôle interne PhiX de 20 pM dénaturée peut être stockée jusqu'à trois semaines entre -25 °C et -15 °C comme des parties aliquotes à usage unique.

Préparation des échantillons pour le séquençage

- Amenez le tampon de dilution de librairie à la température ambiante. Agitez le tampon de dilution de librairie et veillez à ce que tous les précipités soient complètement dissouts.
- Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, décongelez la plaque **SGP** à température ambiante.
- Centrifugez la plaque **SGP** à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- Préparez un nouveau tube Eppendorf (ci-après désigné comme le tube **PAL** [Librairie d'ensembles d'amplicons]).
- Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, mélangez chaque librairie à séquencer en pipettant de haut en bas trois à cinq fois.
- Transférez 5 µl de chaque librairie à séquencer de la plaque **SGP** à la barrette de huit tubes PCR. Scellez la plaque **SGP** avec un joint adhésif de plaque et réservez.



REMARQUE

Après utilisation, conservez la plaque **SGP** scellée à une température entre -25 °C et -15 °C. La plaque **SGP** scellée est stable pendant un maximum de trois jours.

- Combinez et transférez le contenu de la barrette de huit tubes PCR dans le tube **PAL**. Mélangez complètement le tube **PAL** à l'aide d'un agitateur vortex.

- 8 Préparez un nouveau tube Eppendorf (ci-après désigné comme le tube **DAL**[Librairie d'amplicons dilués]d'amplicons).
- 9 Ajoutez 585 µl de tampon de dilution de librairie au tube **DAL**.
- 10 Ajoutez 6 µl de 20 pM de contrôle interne PhiX au tube **DAL**. Pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et assurer un transfert complet.
- 11 Transférez 9 µl de **PAL** dans le tube **DAL** contenant le tampon de dilution de librairie. Pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et assurer un transfert complet.
- 12 Mélangez le tube **DAL** avec un agitateur vortex à vitesse maximale.
- 13 Centrifugez le tube **DAL** à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 14 Incubez le tube **DAL** sur un bloc chauffant à 96 °C pendant deux minutes.
- 15 Après l'incubation, retournez le tube **DAL** une ou deux fois pour mélanger, puis placez-le immédiatement dans un bain d'eau glacée.
- 16 Gardez le tube **DAL** dans le bain d'eau glacée pendant cinq minutes.

Chargement des librairies d'échantillons sur la cartouche

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

Interprétation des résultats

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina est conçu pour séquencer toutes les régions de codage de protéine dans le gène *CFTR* à travers les 27 exons, entre 5 et 30 bases de séquence intronique adjacente, ~100 nt de séquence adjacente aux 5' UTR et 3' UTR et deux mutations introniques profondes (1 811 + 1,6 kbA > G, 3 489 + 10 kbC > T). Le [Tableau 2](#) dresse la liste des régions séquencées exactes. En outre, le test présente également des rapports sur le variant PolyTG/PolyT et deux grandes délétions (*CFTR*dele2, 3, *CFTR*dele22, 23).

- 1 Le rapport des tests répertorie les noms d'échantillons et le génotype pour chaque variant détecté pour un échantillon.
 - Les coordonnées génomiques, le nom d'ADNc selon la Human Genome Variation Society (HGVS) et le nom de protéine (si disponible) sont signalés pour chaque variant.
 - Le type de variant est identifié comme variant à simple nucléotide (SNV), variant de délétion/insertion (DIV), variant de PolyTG/PolyT (PolyTGPolyT) ou grande délétion (DEL).
 - Le typage génotypique (qu'il soit hétérozygote ou homozygote) peut être déduit des renseignements de base « de référence », qui fournissent la séquence de référence à ces coordonnées génomiques, et de la description de « résultat » qui donne les deux allèles sur la position génomique dans l'échantillon. Par exemple, si la référence est « G » et le résultat est « A/G », cela indique une modification G > A à cette coordonnée génomique et un génotype hétérozygote pour l'allèle du variant. De même, si la référence est « G » et le résultat est « T/T », cela indique une modification G > T à cette coordonnée génomique et un génotype homozygote pour l'allèle du variant.
 - La profondeur de séquençage à la position du variant est fournie dans le champ « Depth » (Profondeur) et la fréquence allélique dans la section « Frequency » (Fréquence).
- 2 Le rapport des tests fournit des renseignements relatifs au débit d'appel d'échantillon pour chaque échantillon. Le débit d'appel est calculé comme suit : nombre de positions ou régions de variants qui correspondent à un seuil de valeur de confiance prédéfinie divisé par nombre total de positions ou régions interrogées.
 - La coordonnée génomique pour toute position ou région dont la valeur de confiance est inférieure au seuil est répertoriée séparément dans la section « Coordinates not called » (Coordonnées non appelées). Les utilisateurs doivent évaluer les positions non appelées par rapport aux renseignements sur les variants

pertinents, afin d'identifier des variants qui peuvent être manqués et leurs fréquences de population correspondantes pour déterminer s'il est nécessaire de répéter l'échantillon.

- 3 Un résultat d'échantillon est considéré comme étant valide uniquement si le taux d'appel est $\geq 99\%$. Si le débit d'appel est inférieur à 99% , la performance est rapportée comme « Fail » (Échec), et l'échantillon doit être répété.
- 4 Il est recommandé de soumettre les variants qui ne sont pas validés dans l'étude de précision (voir la section [Précision, page 29](#)) à une vérification par l'utilisateur au moyen d'une méthode de référence validée avant de rapporter les premiers résultats de patient avec ces variants.



REMARQUE

Une mise en phase de l'haplotype doit être envisagée lorsque deux variants ou plus sont détectés.

- 5 Toutes les interprétations des variants doivent être effectuées par un généticien moléculaire clinique diplômé ou équivalent, conformément aux directives et procédures locales¹¹. Les références d'interprétation possible comprennent, sans toutefois s'y limiter, la base de données CFTR2^{12,13}, l'article Sosnay¹⁰, les lignes directrices de 2004 de l'ACMG¹⁴ et les avis de comités de 2011 de l'ACOG⁸.
Pour obtenir des renseignements sur le calcul et la présentation des résultats, ou pour obtenir une description du contenu dans un rapport texte, consultez les guides du logiciel d'analyse installé sur votre MiSeqDx. Pour MiSeq Reporter, consultez le *Guide de référence du logiciel MiSeq Reporter (document n° 15038356)*. Pour Local Run Manager, consultez le *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (Document n° 100000011880)* et le *Guide de flux de travail pour le module d'analyse de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager (document n° 100000012185)*.
- 6 Le généticien a la possibilité d'utiliser le logiciel MiSeq Reporter ou Local Run Manager pour entrer une valeur d'interprétation pour chaque variant signalé sur un échantillon à l'aide d'un menu déroulant. Les choix des valeurs d'interprétation sont les suivants : CF-causing (cause la FK), Mutation of varying clinical consequence (mutation de conséquence clinique variable), Mutation of unknown significance (mutation d'importance inconnue) ou Non-CF causing (ne cause pas la FK). La valeur entrée doit être annexée au fichier de résultats et affichée dans la colonne d'interprétation sur le rapport de test de séquençage clinique.

Procédures de contrôle qualité

Les bonnes pratiques de laboratoire exigent que le matériel de contrôle soit évalué pour détecter d'éventuelles différences dans le traitement du sang et les procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur qui pourraient entraîner une variabilité significative dans les résultats.

- 1 **Contrôles positifs** : un échantillon de contrôle positif d'ADN est requis pour chaque analyse. L'échantillon de contrôle positif d'ADN doit être un échantillon bien caractérisé présentant au moins un variant CFTR connu¹⁵. Illumina recommande d'alterner les contrôles positifs conformes aux normes techniques et directives 2008 de l'ACMG (American College of Medical Genetics) pour les tests de mutation de la FK¹⁶ et aux normes de laboratoire clinique 2013 de l'ACMG pour le séquençage de nouvelle génération¹⁷. L'échantillon de contrôle positif doit générer le génotype attendu. Si le contrôle positif génère un génotype différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. Le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de librairie.
- 2 **Contrôle négatif (sans modèle ni ADN)** : l'utilisation d'un contrôle négatif (sans modèle ni ADN) est requise pour chaque analyse, de façon à détecter les cas possibles de contamination. Le débit d'appel pour le contrôle négatif doit être inférieur à 10% . Si un contrôle négatif génère un débit d'appel $> 10\%$, cela signifie qu'une contamination a peut-être eu lieu durant le traitement du test. Le test est considéré comme un échec et le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de librairie.



REMARQUE

L'échantillon de contrôle négatif est rapporté comme « Pass » (Réussite) s'il génère un débit d'appel $\leq 10\%$ et comme « Fail » (Échec) si le débit d'appel est $> 10\%$. De plus, tout comme dans le cas des échantillons, si le débit d'appel est $< 50\%$, la mention « Sample Failed » (Échec de l'échantillon) figurera dans le rapport.

- 3 **Contrôle de type sauvage** : l'échantillon de contrôle d'ADN de type sauvage est recommandé à chaque analyse. L'échantillon de contrôle de type sauvage doit être un échantillon correctement caractérisé ne

contenant pas de variants CFTR. L'échantillon de contrôle de type sauvage doit générer le génotype attendu. Si le contrôle de type sauvage génère un génotype différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. Le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de librairie.

- 4 Avant la première utilisation de ce produit dans le laboratoire de l'utilisateur, les performances du test doivent être vérifiées en testant un nombre d'échantillons positifs et négatifs possédant des caractéristiques de performances connues.
- 5 Toutes les exigences de contrôle qualité doivent être suivies dans le respect des réglementations locales, régionales et/ou fédérales ou des exigences d'accréditation.

Caractéristiques de performance

Précision

La précision du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina a été évaluée en analysant 500 échantillons qui représentent une vaste gamme de variants CFTR issus de quatre sources distinctes. La source principale de données de précision était une étude de précision clinique menée en utilisant un panel de 366 échantillons. La majorité (n = 355) des échantillons comprenaient des échantillons d'ADNg cliniques archivés et anonymisés isolés à partir de sang humain, les 11 échantillons restants ont été obtenus à partir d'échantillons de lignée cellulaire disponible sur le marché.

Les données provenant de cette étude ont été complétées par les données de précision de 68 échantillons de lignée cellulaire dans l'étude de reproductibilité, 14 échantillons cliniques de l'étude analytique d'évaluation de la méthode d'extraction et 52 échantillons de plasmide synthétique. Les plasmides synthétiques ont été conçus pour inclure le contexte génomique des variants rares et contenaient de un à dix variants dans la même structure. Ils ont été linéarisés, dilués en des nombres de copies équivalents d'ADN génomique, puis mélangés avec des échantillons d'ADN génomique humain présentant un génotype de type sauvage avec des nombres de copies équivalents pour imiter un échantillon hétérozygote.

Pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, un total de 5 206 positions ont été comparées aux méthodes de référence que sont le séquençage bidirectionnel Sanger et le test PCR. Les résultats de génotypage pour les petits sites InDel et SNV, région PolyTG/PolyT comprise, ont été comparés à une analyse de séquençage bidirectionnelle Sanger.

Deux tests validés basés sur la PCR ont été utilisés comme méthode de référence pour les deux grandes délétions du panel. Chaque test duplex PCR a utilisé deux ensembles de primers pour faire la distinction entre les génotypes de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes. L'un des ensembles de primer a été conçu pour border les points de rupture de délétion, tandis que l'autre a amplifié une région interne de la délétion. Les deux produits ont été détectés par une séparation de taille sur un gel d'agarose. Les tests PCR ont été validés en utilisant un panel de 28 échantillons au total (22 échantillons pour chaque délétion) composé d'échantillons d'ADN génomique dérivés de sang et de lignée cellulaire et de plasmides synthétiques, qui englobait les génotypes TS, HET et HOM pour chaque grande délétion. Les tests PCR ont été confirmés avec une spécificité et une reproductibilité à 100 % pour tous les échantillons testés, par le biais d'une évaluation de produits PCR sur un gel d'agarose. La précision des tests PCR a été confirmée au moyen d'un séquençage Sanger et avec une valeur de 100 % pour tous les échantillons.

La précision a été déterminée pour chaque génotype à l'aide de trois mesures statistiques. Une concordance positive (CP) a été calculée pour chaque génotype de variant en divisant le nombre d'échantillons ayant des appels de variant concordants par le nombre total d'échantillons ayant ce variant tel qu'indiqué par les méthodes de référence. Une concordance négative (CN) a été calculée à travers toutes les positions de type sauvage (TS) en divisant le nombre de positions de TS concordantes par le nombre total de positions TS tel qu'indiqué par les méthodes de référence. La concordance globale (CG) a été calculée à travers toutes les positions signalées en divisant le nombre de TS concordants et des positions de variants par le nombre total de positions signalées tel que déterminé par les méthodes de référence.

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx avait une CP au niveau du génotype de 99,66 %, y compris les variants PolyTG/PolyT (100 % excluant les variants PolyTG/PolyT). La CN pour toutes les positions TS était > 99,99 %, et la CG pour toutes les positions rapportées était > 99,99 %.

Tableau 16 Précision globale pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100

Géotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
E92K	c.274G>A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100
D110H	c.328G>C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
R334W	c.1000C>T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100
W401X(c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
W401X(c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	s.o.	PolyTG PolyT	Intron9	369	79	52	3	4 [#]	98,60

Géotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
1461ins4	c.1329_1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADN/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T > G)	c.1647T>G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100

Géotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
H609R	c.1826A>G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_2657+3insA	c.2657+2_2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923 A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100

Géotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
L927P	c.2780T>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140- 26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100

Géotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0 ^y	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADN/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exon22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exon23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	Nom d'ADNc	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appels*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exon24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
Total tous variants (CP)†				2072			3	4	99,66
Total tous TS (CN)				2600928			1	2 [§]	> 99,99
Total tous TS et variants (CG)				2603000			4	6	> 99,99

DIV est l'acronyme pour variant de délétion ou d'insertion.

* Les échantillons n'ont pas été ré-analysés.

^ Le logiciel ne signale pas de nom d'ADNc pour cette coordonnée génomique.

** Le rapport Sanger a classé le variant P205S comme hétérozygote pour l'échantillon clinique. Une révision des données de suivi de Sanger a cependant indiqué que le variant était en réalité homozygote et rapporté de manière incorrecte. Le système MiSeqDx a signalé le variant comme étant homozygote.

† L'un des résultats discordants provient de l'étude de reproductibilité. Le résultat PolyTG/PolyT pour l'échantillon est concordant sur les 18 réplicats, mais discordant avec le séquençage bidirectionnel Sanger.

§ Il a été déterminé que l'échantillon hétérozygote synthétique d'origine a été préparé de manière incorrecte. Lorsqu'il a été testé ultérieurement après avoir été préparé à nouveau, en utilisant le même plasmide, il a pu être détecté.

† La CP à l'exclusion des appels PolyTG/PolyT était de 100 %.

§ Un échantillon d'hétérozygote synthétique pour l'exon 8 a été rapporté comme hétérozygote pour le variant CFTR dele22, 23. Un examen approfondi a révélé que ce résultat provient probablement d'un faible niveau de contamination. En outre, pour un second échantillon, les primers de Sanger n'avaient pas pu détecter entièrement le variant Q1463Q en raison des indels, tant en amont qu'en aval du site du variant.

Tableau 17 Précision des variants PolyTG/PolyT pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

Génotype PolyTG/PolyT	Nbre d'échantillons cliniques	Nbre d'échantillons de lignée cellulaire	Nbre d'échantillons synthétiques	Nombre d'appels erronés	Nombre d'absences d'appels*	% de précision
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31

Génotype PolyTG/PolyT	Nbre d'échantillons cliniques	Nbre d'échantillons de lignée cellulaire	Nbre d'échantillons synthétiques	Nombre d'appels erronés	Nombre d'absences d'appels*	% de précision
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total		448		4	3	98,44

* Les échantillons n'ont pas été ré-analysés.

^ L'un des résultats discordants provient de l'étude de reproductibilité. Le résultat PolyTG/PolyT pour l'échantillon est concordant sur les 18 réplicats, mais discordant avec le séquençage bidirectionnel Sanger.

Reproductibilité

La reproductibilité du système pour fibrose kystique MiSeqDx a été déterminée par une étude en aveugle utilisant trois sites d'essai et deux opérateurs sur chaque site. Deux panels bien caractérisés de 46 échantillons chacun ont été analysés par chaque opérateur sur chaque site pour un total de 276 résultats d'échantillons par opérateur. Ce panel contenait un mélange d'ADN génomique issu des lignées cellulaires lymphoblastiques ayant des mutations connues dans le gène *CFTR*, ainsi que du sang déleucocyté enrichi de lignées cellulaires lymphoblastiques ayant des mutations connues dans le gène *CFTR*. Les échantillons de sang ont été fournis pour permettre l'incorporation des étapes d'extraction utilisées dans la préparation d'ADNg qui sert d'entrée primaire pour le flux de travail du test.

Le débit de passage des échantillons, défini comme le nombre d'échantillons passant les indicateurs de contrôle qualité lors de la première tentative, était de 99,7 %. Tous les résultats des tests sont basés sur un test initial.

La CP au niveau du génotype pour tous les variants, variants PolyTG/PolyT compris, était de 99,22 %, et de 99,60 % en excluant les variants PolyTG/PolyT. La CN pour tous les TS était > 99,70 %, et la CG pour toutes les positions rapportées était > 99,70 %. La CP des variants PolyTG/PolyT était de 97,83 %.

Tableau 18 Reproductibilité du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx (excluant les variants PolyTG/PolyT)

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X(C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delITT	394delITT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T > G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1 [^]	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1 [^]	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1 [^]	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^e	Appels incorrects	
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel ^ε	Appels incorrects	
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Total tous variants (CP)** (incluant les données PolyTG/PolyT dans le Tableau 19)			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
Total tous TS (CN)			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Total tous TS et variants (CG)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

^ε Les échantillons n'ont pas été ré-analysés.

[^] Un réplicat de chacun des échantillons 5 et 75 avait un débit d'appel de 0 %. Un examen approfondi a montré que les échantillons n'avaient vraisemblablement pas été ajoutés à la plaque d'échantillon avant la préparation de la librairie.

* Après vérification, il semble que les échantillons 9 et 10 aient été échangés par l'opérateur avant la préparation de la librairie.

** À l'exclusion des variants PolyTG/PolyT, la CP était de 99,60 %.

Tableau 19 Reproductibilité des variants PolyTG/PolyT pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel	Appels incorrects	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel	Appels incorrects	
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22 %
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78 %
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel	Appels incorrects	
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44 %
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel	Appels incorrects	
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89 %
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel	Appels incorrects	
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
Total des variants PolyTG/PolyT (CP)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83 %

* Les 18 échantillons étaient tous concordants les uns avec les autres, mais discordants avec le séquençage bidirectionnel Sanger.

Extraction d'ADN

Trois méthodes d'extraction disponibles sur le marché et couramment utilisées correspondant à l'extraction à base de billes magnétiques, à la précipitation dans l'alcool et à la filtration sur colonne de silice ont été évaluées à l'aide de sang entier anticoagulé K₂EDTA. Au total, 14 échantillons de sang ont été utilisés pendant l'étude; deux étaient de type sauvage, tandis que les échantillons restants portaient des génotypes uniques représentant neuf variants différents, y compris des variants courants et rares. Pour la variation polyTG/polyT, des échantillons ayant du (T)5-9 et du (TG)10-12 ont été inclus. Les trois méthodes d'extraction d'ADN ont été testées indépendamment par deux opérateurs différents, qui ont effectué trois analyses par méthode d'extraction. Chaque extraction a été réalisée par chaque opérateur à des jours différents. La concentration d'ADN et le rapport A260/A280 des échantillons d'ADNg extrait ont été déterminés par spectrophotométrie. La taille totale des échantillons pour chaque méthode d'extraction dans cette étude était de 168 (14 échantillons × 2 opérateurs/méthode d'extraction × 3 analyses/opérateur × 2 réplicats/échantillon d'ADNg extrait).

Méthode d'extraction	Nombre d'échantillons testés	Débit d'appel	Précision	Débit au premier passage de l'échantillon*
Précipitation dans l'alcool	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %
Filtration sur colonne de silice	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %
Extraction à base de billes magnétiques	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %

* Pourcentage d'échantillons présentant un taux d'appel > 99 % dans la première analyse.

Entrée d'ADN

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

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

Substances interférentes

Pour évaluer l'incidence de substances interférentes sur le système pour fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina, les performances du test ont été évaluées en présence et en l'absence d'éventuels éléments interférents. Seize échantillons de sang entier avec des génotypes FK uniques ont été testés dans l'étude. Quatre substances interférentes endogènes (bilirubine, cholestérol, hémoglobine et triglycérides) ont été testées en les intégrant à des échantillons sanguins avant l'extraction d'ADN. Les limites de concentration pour chaque substance sont indiquées dans le tableau ci-dessous. En outre, pour évaluer l'interférence résultant du prélèvement sanguin (petit volume), de l'EDTA a été intégré aux échantillons de sang. Pour évaluer l'interférence résultant de la préparation d'échantillon, le tampon de lavage final d'une méthode de filtration sur colonne de silice a été ajouté à de l'ADN génomique purifié.

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx a atteint un débit d'appel de 100 % pour tous les échantillons testés, et un taux de reproductibilité de 100 % de typages génotypiques entre les échantillons en présence et en l'absence de substances interférentes. Aucune interférence n'a été observée au niveau de tous les éléments interférents endogènes ou exogènes.

Pour évaluer l'incidence d'une interférence du primer d'index de multiplexage, une étude de contamination croisée utilisant deux échantillons, chacun présentant des génotypes homozygotes uniques au niveau de quatre positions génomiques différentes, et deux primers d'index respectifs a été effectuée. Aucun changement concernant l'appel de variants n'a été observé avec des niveaux de contamination < 40 %. Le génotype de l'échantillon est devenu hétérozygote avec des niveaux ≥ 40 %.

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

Références

- Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575-606.
- Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et coll. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12) : 851–868.
- Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA) : University of Washington; 2008. Disponible sur www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [En ligne] Mise à jour le 19 février 2008.
- Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponible sur www.uptodate.com. [En ligne] 7 décembre 2012.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et coll. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2) : S4-S14.
- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponible sur www.genet.sickkids.on.ca/app. [En ligne] Août 2013.
- Comité sur la génétique. (Avril 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486 : 1-4.
- Rohlfes EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et coll. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6) : 841–848.
- Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10) : 1160-1167
- Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et coll. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7 : 179–196.
- Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponible sur www.cftr2.org. [En ligne] Août 2013.
- The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponible sur www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [En ligne] Présenté par Garry Cutting au nom du

- projet CFTR2 lors de la 25^e Conférence Nord-américaine sur la fibrose kystique (NACFC) parrainée par la Fondation de la fibrose kystique. 4 novembre 2011. Anaheim, CA.
- 14 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et coll. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5) : 387-391.
 - 15 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et coll. (Mai 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3) : 186–193.
 - 16 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et coll. (Édition 2008, révisée en mars 2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
 - 17 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et coll. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9) : 733-747.

Brevets et marques de commerce

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

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

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

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

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

AMPure, Beckman et Beckman Coulter sont des marques déposées ou des marques de commerce de Beckman Coulter, Inc.

Coordonnées



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, CA 92122 États-Unis

+(1) 800 809-ILMN (4566)

+(1) 858 202-4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.

Freddy van Riemsdijkweg 15

5657 EE Eindhoven

Pays-Bas

Commanditaire australien :

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australie

Étiquette du produit

Pour obtenir des informations complètes sur les symboles présents sur l'emballage et les étiquettes du produit, consultez la légende des symboles sur support.illumina.com, dans l'onglet *Documentation and Literature* (Documentation et littérature) de votre trousse.