

Notice

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT
POUR EXPORTATION UNIQUEMENT

Utilisation prévue

Le Instrument NovaSeq 6000Dx est conçu pour le séquençage de bibliothèques d'ADN lorsqu'il est utilisé dans le cadre de tests de diagnostic *in vitro* (IVD). Le Instrument NovaSeq 6000Dx est destiné à être utilisé avec des réactifs et des logiciels d'analyse IVD spécifiques enregistrés, certifiés ou approuvés.

Principes de procédures

Le Instrument NovaSeq 6000Dx Illumina® est conçu pour le séquençage de bibliothèques d'ADN dans le cadre de tests de diagnostic *in vitro*. Au départ, le NovaSeq 6000Dx utilise des bibliothèques préparées à partir de l'ADN où les index d'échantillons et les séquences de capture sont ajoutés aux cibles amplifiées. Les bibliothèques d'échantillons sont emprisonnées sur une Flow Cell et séquencées avec l'instrument en utilisant la chimie de séquençage par synthèse (SBS). La chimie SBS utilise une méthode basée sur des terminateurs réversibles pour détecter les bases à simple nucléotide à marqueur fluorescent, à mesure qu'elles sont intégrées aux brins d'ADN croissants. Le logiciel Real-Time Analysis (RTA) effectue des analyses d'images et des définitions de bases et affecte un score de qualité à chaque base pour chaque cycle de séquençage. Une fois l'analyse primaire terminée, une analyse secondaire peut être faite sur le Serveur Illumina DRAGEN pour NovaSeq 6000Dx pour le traitement des définitions de bases. Le NovaSeq 6000Dx utilise différentes applications pour effectuer l'analyse secondaire en fonction du flux de travail. Dans le cas de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, le traitement comprend le démultiplexage, la génération de fichiers FASTQ, l'alignement, la définition des variants et la génération de fichiers de définition de variant (VCF et gVCF). Les fichiers VCF et gVCF contiennent des renseignements sur les variants germinaux ou somatiques (en fonction du flux de travail sélectionné) trouvés à des positions spécifiques dans un génome de référence.

Mode de fonctionnement double

Le NovaSeq 6000Dx comprend un disque dur de démarrage unique avec des modes de diagnostic *in vitro* (IVD) et de recherche uniquement (RUO) séparés. Le mode est sélectionné à l'aide de la bascule sur le écran Sequencing (Séquençage). Le mode sélectionné est clairement marqué dans l'interface sur tous les écrans. Les tests de séquençage IVD, y compris l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dans les flux de travail germinaux et/ou somatiques, sont exécutés en mode IVD. Seuls les réactifs de séquençage IVD peuvent être utilisés en mode IVD. Les caractéristiques de performance et les limites de la procédure pour le NovaSeq 6000Dx ont été établies à l'aide de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en mode IVD.

Limites de la procédure

1. Destiné au diagnostic *in vitro* uniquement.
2. L'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, lorsqu'elle est utilisée avec NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) peut fournir :
 - Sortie de séquençage :
 - ≥ 1.0 terabases (Tb) avec la trousse S2
 - ≥ 3.0 Tb avec la trousse S4
 - Longueur de lecture (en analyse à lecture appariée) de 2×150 paires de base (pb)
 - Bases supérieures à Q30 $\geq 85\%$ à une longueur de lecture de 2×150 pb Au moins 85% des bases ont un score de qualité Phred supérieur à 30, indiquant que la précision des définitions de bases est supérieure à $99,9\%$.
3. Les insertions de longueur > 18 bp et les délétions de longueur > 21 bp n'ont pas été validées.
4. Les variants importants, y compris les variants à multiples nucléotides (MNV) et les indels importants, peuvent être désignés comme plusieurs variants distincts de plus petite taille dans le fichier VCF de sortie.
5. Les petits MNV sont signalés comme des variants distincts dans le fichier VCF de sortie.
6. Les délétions sont signalées dans le fichier VCF à la coordonnée de la base précédente conformément au format VCF. Par conséquent, considérez les variants adjacents avant de signaler qu'un appel de base individuel est une référence homozygote.
7. Limites relatives aux variants germinaux :
 - Le NovaSeq 6000Dx lorsqu'il est utilisé avec le flux de travail de génération d'analyse FASTQ et VCF pour les variants germinaux de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est conçu pour produire des résultats qualitatifs aux fins de la définition des variants germinaux (p. ex., homozygote, hétérozygote, type sauvage).
 - La variation du nombre de copies peut affecter l'identification d'un variant comme homozygote ou hétérozygote.
 - Le système ne signalera pas plus de deux variants à un seul locus, même en présence d'une variation du nombre de copies.
8. Limites relatives aux variants somatiques :
 - Le NovaSeq 6000Dx, lorsqu'il est utilisé avec le flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour variants somatiques de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, est conçu pour produire des résultats qualitatifs aux fins de la définition des variants somatiques (c.-à-d. présence d'un variant somatique).

- Le flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour les variants somatiques ne peut pas différencier les variants germinaux et somatiques. Le flux de travail est conçu pour détecter les variants à travers une plage de fréquences de variant, mais la fréquence de variant ne peut pas être utilisée pour différencier les variants somatiques et les variants germinaux.
- Les tissus normaux dans le spécimen affectent la détection des variants. La limite de détection signalée est basée sur la fréquence de variant par rapport à l'ADN total extrait du tissu tumoral et normal.
- Si plus d'un allèle variant est appelé au même locus, aucun des allèles ne sera signalé comme variant passant. Au lieu de cela, l'ensemble complet des allèles sera signalé mais filtré via le marqueur multiallélique.

Procédures de contrôle de la qualité

Le logiciel NovaSeq 6000Dx évalue chaque séquençage, chaque échantillon et chaque définition de bases par rapport à des métriques de contrôle de la qualité. Les contrôles positifs et négatifs sont aussi recommandés dans la préparation des bibliothèques et doivent faire l'objet d'une évaluation. Évaluez les contrôles comme suit :

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

Composants du produit

Le Illumina NovaSeq 6000Dx se compose des éléments suivants :

1. Instrument NovaSeq 6000Dx (N° de référence 20068232)
2. Les composants logiciels pour le incluent les éléments suivants :

Application logicielle	Emplacement de l'installation	Fonction	Description
Logiciel d'exploitation NovaSeq	NovaSeq 6000Dx	Contrôle le fonctionnement de l'instrument	Le Logiciel d'exploitation NovaSeq (NVOS) prend en charge le fonctionnement de l'instrument lors du séquençage et génère des images à utiliser avec le logiciel Real-Time Analysis (RTA).

Application logicielle	Emplacement de l'installation	Fonction	Description
Logiciel Real-Time Analysis (RTA).	NovaSeq 6000Dx	Réalise des analyses primaires	L'application logicielle RTA convertit les images générées par NVOS pour chaque tuile par cycle de l'exécution de séquençage en fichiers de définition de bases. Les fichiers de définition de bases sont des entrées pour les modules d'application sur le Serveur Illumina DRAGEN pour NovaSeq 6000Dx. L'application logicielle RTA n'est pas dotée d'une interface utilisateur.
Illumina Run Manager	Serveur DRAGEN Illumina	Contrôle la configuration et la gestion de l'analyse	Illumina Run Manager fournit la gestion des utilisateurs et des instruments, héberge le logiciel d'application et permet l'utilisation des modules d'analyse secondaire de génomique accélérés par le matériel DRAGEN.

Conditions de fonctionnement

Pour plus d'informations sur les conditions de fonctionnement, reportez-vous à la section Considérations environnementales du *Documentation sur l'instrument NovaSeq 6000Dx*.

Élément	Spécification
Température	Maintenez la température du laboratoire entre 19 °C et 25 °C (22 °C ±3 °C). Cette température est la température de fonctionnement de l'instrument. Au cours d'une analyse, empêchez toute variation de la température ambiante excédant ± 2 °C.
Humidité	Maintenez une humidité relative sans condensation comprise entre 20 et 80 %. Conservez le système à une altitude inférieure à 2 000 mètres.

Consommables et équipement

Cette section répertorie tout ce qui est nécessaire pour une analyse de séquençage sur le NovaSeq 6000Dx. Cela inclut les consommables fournis par Illumina et les consommables et équipements auxiliaires que vous devez acheter auprès d'autres fournisseurs. Ces éléments sont nécessaires pour compléter le protocole et effectuer les procédures de maintenance et de dépannage.

Pour plus d'informations sur les symboles des consommables ou sur l'emballage des consommables, reportez-vous au [Légende des symboles Illumina IVD \(document n° 1000000039141\)](#).

Consommables nécessaires au séquençage

Une analyse NovaSeq 6000Dx nécessite les composants suivants :

- Cartouche de tampon
- Cartouche d'amplification
- Flow Cell
- Tube de librairies
- Cartouche SBS

Les consommables NovaSeq 6000Dx sont emballés dans les configurations suivantes. Chaque composant utilise l'identification par radiofréquence (RFID) pour un suivi précis des consommables et pour des questions de compatibilité.

Tableau 1 Consommables fournis par Illumina

Nom de la trousse	Contenu	Numéro de référence Illumina
NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles)	Cartouche d'amplification S2 Flow Cell S2 Cartouche SBS S2	20046931
NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles)	Cartouche d'amplification S4 Flow Cell S4 Cartouche SBS S4	20046933
Cartouche de tampon S2 NovaSeq 6000Dx	Cartouche de tampon S2	20062292
Cartouche de tampon S4 NovaSeq 6000Dx	Cartouche de tampon S4	20062293
Tube de librairies NovaSeq 6000Dx	Tube de librairies unique	20062290
Tube de bibliothèque NovaSeq 6000Dx, paquet de 24	24 tubes de librairies	20062291

Lorsque vous recevez votre trousse, stockez rapidement ses composants à la température indiquée afin de garantir leurs performances.

Tableau 2 Stockage de la trousse NovaSeq 6000Dx

Consommable	Quantité	Température de stockage	Longueur	Largeur	Hauteur
Flow Cell	1	2 °C à 8 °C	27,7 cm (10,9 po)	17 cm (6,7 po)	3,8 cm (1,5 po)

Consommable	Quantité	Température de stockage	Longueur	Largeur	Hauteur
Cartouche d'amplification	1	-25 °C à -15 °C	29,5 cm (11,6 po)	13 cm (5,1 po)	9,4 cm (3,7 po)
Cartouche SBS	1	-25 °C à -15 °C	30 cm (11,8 po)	12,4 cm (4,9 po)	11,2 cm (4,4 po)
Cartouche de tampon	1	15 °C à 30 °C	42,2 cm (16,6 po)	20,6 cm (8,1 po)	21,1 cm (8,3 po)
Tube de librairies	1	15 °C à 30 °C	4,1 cm (1,6 po)	2,3 cm (0,9 po)	12,4 cm (4,9 po)

Détails sur les consommables

Pour identifier les composants de trousse compatibles, les Flow Cell et les cartouches affichent des symboles indiquant le mode de la trousse.

Tableau 3 Étiquetage de compatibilité

Mode de la trousse	Marquage sur l'étiquette	Description
Composants de trousse S2		Une Flow Cell S2 génère jusqu'à 4,1 milliards de lectures uniques passant le filtre avec un rendement jusqu'à 1 000 Go à 2 x 150 bp. La trousse S2 permet de réaliser un séquençage rapide pour la plupart des applications à débit élevé.
Composants de trousse S4		Une Flow Cell S4 génère jusqu'à 10 milliards de lectures uniques passant le filtre avec un rendement jusqu'à 3 000 Go à 2 x 150 bp. C'est une version à quatre lignes de la Flow Cell conçue pour un rendement maximal.

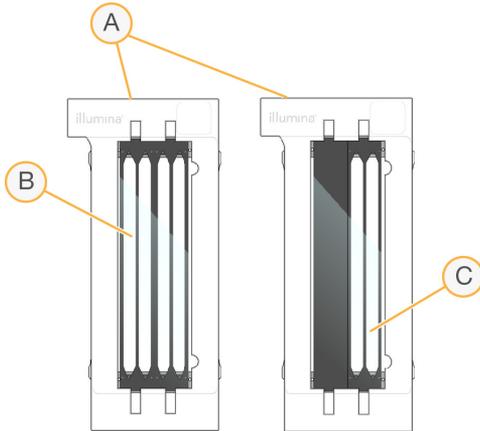
Flow Cell

La Flow Cell NovaSeq 6000Dx est une Flow Cell structurée enchâssée dans une cartouche. La Flow Cell est un substrat de verre contenant des milliards de nanopuits arrangés de façon ordonnée. Les amplifiats sont générés dans les nanopuits, dans lesquels le séquençage est effectué.

Chaque Flow Cell possède plusieurs lignes pour les librairies regroupées de séquençage. La Flow Cell S2 a deux lignes et que la Flow Cell S4 en a quatre. Chaque ligne est imagée en de multiples témoins. Le logiciel divise ensuite l'image de chaque témoin en portions plus petites, appelées plaques.

Il est normal que de petites rayures et d'autres défauts superficiels mineurs soient visibles sur la Flow Cell, ce qui ne devrait pas compromettre la qualité des données ni le rendement. Illumina recommande l'utilisation de ces Flow Cell selon les procédures habituelles.

Figure 1 Flow Cell



- A. Cartouche de Flow Cell
- B. Flow Cell à quatre lignes (S4)
- C. Flow Cell à deux lignes (S2)

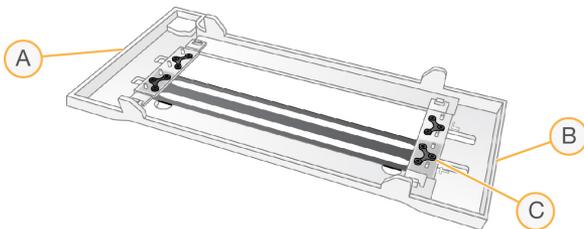
Le dessous de chaque Flow Cell présente plusieurs joints. Les librairies et les réactifs entrent dans les lignes de la Flow Cell par les joints sur l'extrémité d'entrée de la Flow Cell. Les réactifs usagés sont expulsés des lignes par les joints sur l'extrémité de sortie.



ATTENTION

Évitez de toucher les joints lorsque vous manipulez une Flow Cell.

Figure 2 Flow Cell inversée



- A. Extrémité de sortie
- B. Extrémité d'entrée
- C. Joint (un sur quatre)

Cartouche de tampon, cartouche d'amplification et cartouche SBS

La cartouche de tampon, la cartouche d'amplification et la cartouche SBS NovaSeq 6000Dx comportent des réservoirs scellés par des opercules en aluminium et préremplis de réactifs, de tampons ou de solution de lavage. La trousse de réactifs NovaSeq 6000Dx comprend une cartouche d'amplification et une cartouche SBS. La cartouche de tampon est vendue séparément.

Les cartouches sont chargées directement dans l'instrument, ont un code de couleurs et portent une étiquette pour éviter les erreurs de chargement. Des guides situés dans les tiroirs du réfrigérateur pour réactifs et de tampons assurent la bonne orientation des cartouches.

Tableau 4 Cartouches NovaSeq 6000Dx

Consommable	Description
 <p>Cartouche de tampon</p>	<p>Cartouche préremplie de tampons de séquençage et pouvant peser jusqu'à 6,8 kg (15 lbs). Une poignée de plastique facilite le transport, le chargement et le déchargement de la cartouche.</p> <p>La cartouche tampon contient des réactifs sensibles à la lumière. Conservez la cartouche de tampon emballée jusqu'à son utilisation.</p>
 <p>Cartouche d'amplification</p>	<p>Cartouche préremplie avec des réactifs de génération d'amplifiats, des réactifs d'indexage, des réactifs appariés et une solution de lavage. Comprend une position désignée pour le tube de librairies. Son étiquette orange la distingue de la cartouche SBS.</p> <p>En position n° 30, le réactif de dénaturation contient du formamide, un amide organique et une toxine reproductive. Pour faciliter l'élimination sûre de tout réactif non utilisé après l'analyse de séquençage, ce réservoir est amovible.</p>
 <p>Cartouche SBS</p>	<p>Cartouche préremplie avec des réactifs de séquençage dont le volume est fonction du nombre de cycles prévu pour la trousse. Pour chacune des trois positions des réactifs, une position adjacente est réservée au lavage automatique après analyse. L'étiquette grise distingue la cartouche SBS de la cartouche d'amplification.</p> <p>La cartouche SBS contient des réactifs sensibles à la lumière. Gardez la cartouche SBS emballée jusqu'à utilisation.</p>

Réservoirs réservés aux cartouches d'amplification

Trois réservoirs sont réservés pour les primers personnalisés et une position vide est réservée pour le tube de librairies. Pour des raisons de traçabilité des échantillons, le tube de librairies est chargé dans la cartouche d'amplification au moment de la configuration de l'analyse et reste dans la cartouche jusqu'à la fin de l'analyse.

Figure 3 Réservoirs numérotés

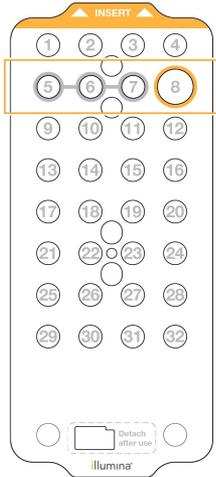


Tableau 5 Réservoirs pour cartouches d'amplification

Position	Réservé pour
5, 6 et 7	Primers personnalisés facultatifs
8	Tube de librairies

Consommables et équipement fournis par l'utilisateur

Tableau 6 Consommable

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Flacon pour centrifugeuse, 500 ml	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de Tween 20 pour un lavage de maintenance.
Tube pour centrifugeuse, 30 ml	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de NaOCl pour un lavage de maintenance.
Gants jetables sans talc	Fournisseur de laboratoire général	Usage général.
Lingettes imbibées d'alcool isopropylique à 70 % ou Lingettes imbibées d'alcool à l'éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714, ou équivalent Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage des composants avant l'analyse et usage général.

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Serviette de laboratoire, non-pelucheuse	VWR, n° de référence 21905-026, ou équivalent	Séchage de la platine de Flow Cell et usage général.
NaOCl de qualité « réactif », 5 %	Sigma-Aldrich, n° de référence 239305	Effectuer un lavage de maintenance.
Embouts de pipette, 2 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
Embouts de pipette, 20 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
Embouts de pipette, 200 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
Embouts de pipette, 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
Alcool isopropylique (99 %) de qualité réactif ou spectrophotométrique, flacon de 100 ml	Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage périodique des composants optiques et support de la cartouche de nettoyage de l'objectif.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n° de référence P7949	Effectuer un lavage de maintenance.
Eau destinée à un usage en laboratoire	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de Tween 20 et d'hypochlorite de sodium pour les lavages de maintenance.

Tableau 7 Équipement

Élément	Source
Congélateur, de -15 à -25 °C	Fournisseur de laboratoire général
Cylindre gradué, 500 ml, stérile	Fournisseur de laboratoire général
Sceau d'eau glacée	Fournisseur de laboratoire général
Pipette, 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipette, 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipette, 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Réfrigérateur, de 2 °C à 8 °C	Fournisseur de laboratoire général
Cuve, bains d'eau*	Fournisseur de laboratoire général

* Utilisez une cuve pouvant accueillir deux cartouches de réactifs et le niveau d'eau approprié. Par exemple, une cuve de 61 cm x 91,4 cm x 25,4 cm (24 po x 36 po x 10 po).

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

Toujours utiliser de l'eau destinée à un usage en laboratoire ou de l'eau désionisée pour effectuer les procédures relatives à l'instrument. Ne jamais utiliser l'eau du robinet. Utiliser uniquement les catégories d'eau suivantes ou leurs équivalents :

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

Mode d'emploi

Les instructions suivantes concernent l'exécution du Instrument NovaSeq 6000Dx en mode de fonctionnement IVD en utilisant les configurations de trousse S2 ou S4.

Créer une analyse de séquençage

Utilisez les étapes suivantes pour créer une analyse à l'aide de Illumina Run Manager en mode IVD ou RUO. Vous pouvez également sélectionner **Import Run (Importer une analyse)** dans l'onglet Planned (Planifiée) de la page Runs (Analyses) et importer une feuille d'échantillons. Créez de nouvelles analyses sur l'instrument ou en accédant à Illumina Run Manager à l'aide d'un navigateur sur un ordinateur en réseau.

REMARQUE Les informations exactes requises par chaque application d'analyse diffèrent, mais le processus de création d'une analyse comprend les étapes suivantes.

1. Dans l'onglet Planned (Planifié) de l'écran Runs (Analyses), sélectionnez **Create Run (Créer une analyse)**.
2. Sélectionnez une application, puis sélectionnez **Next (Suivant)**.
3. Parcourez les écrans de paramètres. Selon votre application, les écrans affichés peuvent inclure les éléments suivants :
 - **Run Settings (Paramètres de l'analyse)** : entrez les paramètres de l'analyse.
 - **Sample Data (Données d'échantillon)** : entrez les données d'échantillon manuellement ou en important un fichier CSV contenant des informations sur l'échantillon. Les noms d'échantillon doivent être uniques.
 - **Analysis settings (Paramètres d'analyse)** : entrez les paramètres d'analyse.
4. Sur l'écran Review (Examiner), passez en revue les informations sur l'analyse et sélectionnez **Save (Enregistrer)**.

L'analyse est ajoutée en haut de la liste des analyse dans l'onglet Planned (Planifié).

Préparer les consommables

Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification

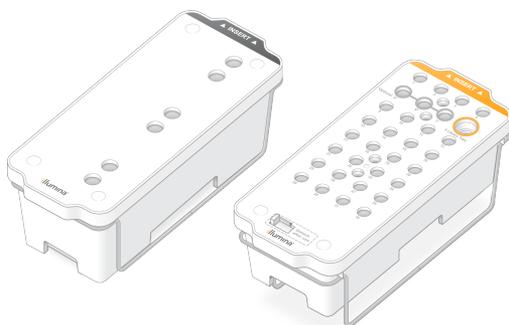


ATTENTION

Utiliser de l'eau chaude pour décongeler les réactifs peut réduire la qualité des données ou causer un échec de l'analyse.

1. Si une analyse de séquençage est en cours, assurez-vous que les deux côtés de l'instrument seront disponibles une fois les réactifs décongelés.
2. Retirez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification de leur lieu de stockage maintenu entre -25 °C et 15 °C.
3. Placez chaque cartouche dans le support de décongélation en broche. Les supports sont fournis avec l'instrument et empêchent les cartouches de chavirer dans le bain d'eau.

Figure 4 Cartouches dans les supports de décongélation en broche



4. Utilisez le tableau ci-dessous pour déterminer la durée de décongélation. Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19 °C à 25 °C). Immergez jusqu'à la moitié environ.

Cartouche	Durée de décongélation
Cartouche SBS S2	4 heures
Cartouche d'amplification S2	Jusqu'à 2 heures
Cartouche SBS S4	4 heures
Cartouche d'amplification S4	Jusqu'à 4 heures



ATTENTION

Si vous ne démarrez pas le séquençage dans les quatre heures suivant la décongélation des cartouches de réactifs, la qualité des données risque d'être réduite.

5. Séchez bien la base des cartouches avec des essuie-tout. Épongez entre les puits pour que toute l'eau soit enlevée.
6. Vérifiez la présence d'eau sur les opercules en aluminium. S'il y a de l'eau, épongez-la avec un tissu non pelucheux.
7. Vérifiez le dessous de chaque cartouche pour vous assurer qu'il n'y a pas de glace dans les réservoirs, ce qui indique que les réactifs sont décongelés.
8. Retournez chaque cartouche 10 fois pour mélanger les réactifs.



ATTENTION

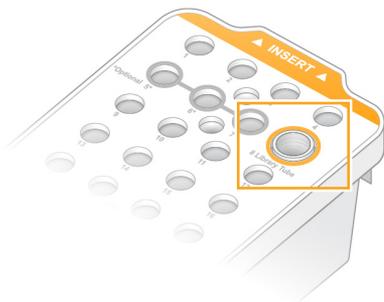
Le fait de ne pas retourner complètement les cartouches peut entraîner une réduction de la qualité des données.

9. Tapotez doucement le fond de chaque cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.

Charger le tube de librairies

1. Sans déranger la librairie dans la partie inférieure, insérez le tube de librairies sans bouchon contenant le groupe de librairies dénaturées et diluées dans la position du **tube de librairies** (n° 8) de la cartouche d'amplification.
2. Insérez le tube de librairies dans la position n° 8 de la cartouche d'amplification.

Figure 5 Tube de librairies sans bouchon chargé dans la position n° 8



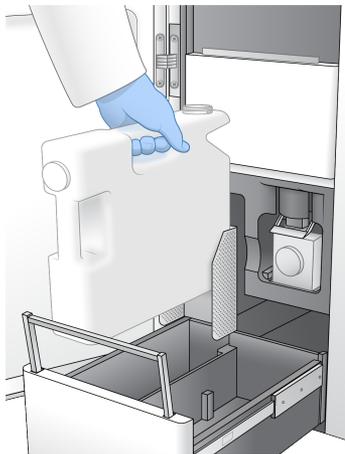
Vider les flacons de réactifs usagés

Suivez les instructions ci-dessous pour vider les flacons de réactifs usagés à *chaque* analyse de séquençage. Si votre système est configuré pour évacuer les réactifs usagés vers l'extérieur, le petit flacon reçoit des réactifs usagés et doit être vidé à chaque analyse de séquençage. Le grand flacon doit rester en place.

1. Retirez et videz le petit flacon de réactifs usagés, comme suit.
 - a. Soulevez le levier et retirez le petit flacon de réactifs usagés du renforcement. Tenez le flacon par les côtés.
 - b. Retirez le bouchon fileté du porte-bouchon situé sur le devant du flacon.

- c. Fermez hermétiquement le flacon à l'aide du bouchon pour prévenir les déversements.
 - d. Jetez le contenu conformément aux normes en vigueur, en le gardant séparé du contenu de l'autre flacon.
 - e. Remettez le flacon débouché dans le renforcement, puis abaissez le levier. Placez le bouchon sur le porte-bouchon.
2. Retirez et videz le grand flacon de réactifs usagés, comme suit.
 - a. À l'aide de la poignée du dessus, retirez le grand flacon de réactifs usagés du côté gauche du tiroir de tampon.
 - b. Retirez le bouchon fileté du porte-bouchon situé sur le devant du flacon.
 - c. Fermez hermétiquement le flacon à l'aide du bouchon pour prévenir les déversements.
 - d. Jetez le contenu conformément aux normes en vigueur. Tenez les deux poignées durant la vidange.
 - e. Remettez le flacon débouché dans le tiroir de tampon. Placez le bouchon sur le porte-bouchon.

Figure 6 Remise en place du flacon vide



3. Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc.



ATTENTION

Enfilez toujours une nouvelle paire de gants sans talc après avoir manipulé le flacon du réactif.

4. Fermez le tiroir de tampon, puis fermez les portes du compartiment des liquides.



ATTENTION

Le fait de ne pas vider les flacons de réactifs usagés peut entraîner un arrêt de l'analyse et un débordement qui endommage l'instrument et constitue un risque pour la sécurité.

Préparer la Flow Cell

1. Sortez un nouvel emballage de Flow Cell du lieu de stockage à une température maintenue entre 2 et 8 °C.
2. Placez la Flow Cell emballée et scellée de côté pendant 10-15 minutes pour que la Flow Cell atteigne une température ambiante (19 °C à 25 °C).

Utilisez la Flow Cell dans les 12 heures après avoir l'avoir retirée de son emballage.

Charger les consommables

Utilisez les instructions suivantes pour démarrer la configuration de l'analyse et charger les consommables.

1. Sur l'écran d'accueil, sélectionnez **Séquenceur**, puis choisissez l'analyse d'une cellule de débit unique ou d'une cellule de débit double.
 - **A+B**—configurez l'analyse d'une cellule de débit double.
 - **A**—configurez l'analyse d'une cellule de débit unique sur le côté A.
 - **B**—configurez l'analyse d'une cellule de débit unique sur le côté B.

Le système lance la configuration de l'analyse, en commençant par charger la Flow Cell.

2. Sélectionnez **OK** pour accepter l'avertissement et ouvrir la porte de la Flow Cell.



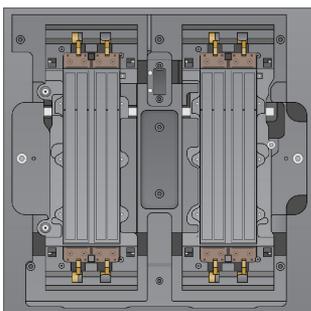
ATTENTION

Gardez la surface dégagée pendant l'analyse de séquençage et évitez de vous appuyer sur l'instrument. Toute pression sur la porte de la Flow Cell peut déclencher son ouverture, ce qui interrompt l'analyse. Les analyses interrompues ne peuvent pas être reprises.

Charger la Flow Cell

1. Retirez la Flow Cell de l'analyse précédente, si elle se trouve encore dans l'appareil.
2. Si des particules sont visibles sur la platine de Flow Cell, nettoyez toute la platine, y compris l'interface fluïdique et la surface de verre de la cible d'alignement optique, avec une lingette imbibée d'alcool. Séchez à l'aide d'un tissu non pelucheux.

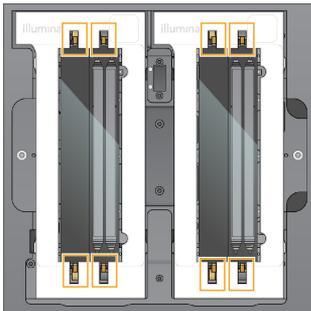
Figure 7 Platine de Flow Cell



3. Sortez la Flow Cell de son emballage conformément aux instructions suivantes :

- a. Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc pour éviter de contaminer la surface en verre de la Flow Cell.
 - b. Placez l'emballage en aluminium sur une surface plate, puis ouvrez-le en partant de l'extrémité angulaire.
 - c. Retirez l'emballage en plastique transparent qui couvre la Flow Cell.
 - d. Sortez la Flow Cell de son emballage. Saisissez la Flow Cell par les côtés en évitant de toucher le verre et les joints du dessous.
 - e. Si des particules sont visibles sur l'une ou l'autre des surfaces en verre de la Flow Cell, nettoyez la surface à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse et séchez-la avec un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
 - f. Jetez l'emballage de manière appropriée.
4. Alignez la Flow Cell sur les quatre pinces relevées et placez-la sur la platine de Flow Cell.

Figure 8 Flow Cell chargées, alignées sur les pinces



5. Sélectionnez **Close Flow Cell Door (Fermer la porte de la Flow Cell)**.
 La porte de la Flow Cell se ferme, les capteurs et la RFID sont vérifiés, et l'identifiant de la Flow Cells s'affiche à l'écran.

Charger la cartouche SBS et la cartouche d'amplification

1. Ouvrez les portes du compartiment des liquides, puis ouvrez la porte du réfrigérant pour réactifs.
2. Retirez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification de l'analyse précédente.
 Les opercules en aluminium des cartouches usagées sont percés.
3. Mettez les contenus inutilisés au rebut conformément aux normes en vigueur.
 Aux fins de l'élimination en toute sécurité de la position n° 30 de la cartouche d'amplification, consultez la section [Détacher la position n° 30 à la page 21](#).

4. Chargez les cartouches préparées dans le tiroir du réfrigérateur pour réactifs de sorte que les étiquettes Insert soient face au dos de l'instrument.
 - Placez la cartouche SBS (étiquette grise) dans la position de gauche.
 - Placez la cartouche d'amplification (étiquette orange) contenant le tube de librairies débouché dans la position de droite.

Figure 9 Cartouches de réactifs chargées

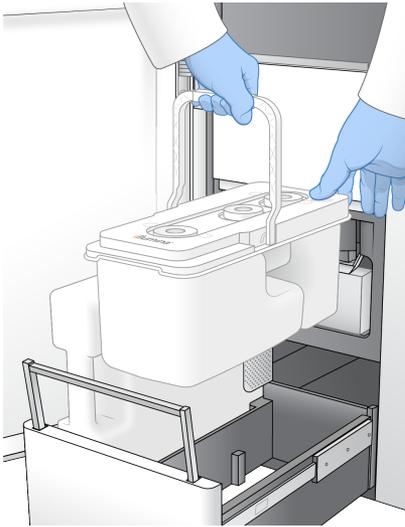


5. Glissez le tiroir dans le réfrigérateur, puis fermez la porte du réfrigérateur pour réactifs. Les capteurs et les RFID sont vérifiés. Les identifiants du tube de librairies et des deux cartouches s'affichent à l'écran.

Charger la cartouche de tampon

1. Tirez la poignée métallique pour ouvrir le tiroir de tampon.
2. Retirez la cartouche de tampon usagée du côté droit du tiroir de tampon. Les opercules en aluminium des cartouches de tampon usagées sont percés.
3. Placez une nouvelle cartouche de tampon dans le tiroir de tampon, de sorte que l'étiquette Illumina soit face au devant du tiroir. Alignez la cartouche avec les guides surélevés dans le fond du tiroir et sur les côtés. Lorsqu'elle est chargée correctement, la cartouche de tampon repose uniformément dans l'appareil, et le tiroir peut fermer.

Figure 10 Charger la cartouche de tampon



4. Cochez la case confirmant que les deux flacons de réactifs usagés sont vides une fois que les deux flacons de réactifs ont été vidés.

REMARQUE Le fait de ne pas vider les flacons de réactifs usagés peut entraîner un arrêt de l'analyse et un débordement qui endommage l'instrument et constitue un risque pour la sécurité.

5. Une fois les consommables ajoutés, sélectionnez **Run Selection (Analyser la sélection)** pour continuer.

Sélectionnez et lancez l'analyse

L'instrument scanne l'ID du tube de librairie et recherche une analyse planifiée correspondante.

1. Si une analyse planifiée correspondant à l'ID de tube de librairie est trouvée pour chaque côté utilisé, la sélection de l'analyse est ignorée. Sélectionnez **Review (Réviser)** pour continuer.
2. S'il n'y a pas d'analyse correspondante pour un côté ou l'autre, sélectionnez **Run Selection (Sélection de l'analyse)**, puis sélectionnez une ou plusieurs analyses planifiées.
La même analyse planifiée ne peut pas être sélectionnée des deux côtés.
3. Lorsqu'une ou plusieurs analyses sont sélectionnées, sélectionnez **Pre-Run Checks (Vérifications avant analyse)**.
4. La vérification avant analyse prend environ 5 minutes.
L'analyse débute automatiquement après la réussite de la vérification.

REMARQUE Pour éviter de surcharger le disque dur, ne copiez aucune donnée sur le lecteur C:\ après le démarrage de l'analyse.

Erreurs lors de la vérification avant analyse

1. Si les vérifications avant analyse échouent en raison d'une erreur liée au capteur, comme une Flow Cell non détectée, quittez et redémarrez le flux de travail.
2. Pour les autres types d'échec des vérifications avant analyse, sélectionnez **Retry (Réessayer)** pour redémarrer la vérification qui a échoué ou **Retry All (Réessayer tout)** pour redémarrer toutes les vérifications.
Les erreurs doivent être résolues pour que l'analyse puisse démarrer.
3. Sélectionnez l'icône **Error (Erreur)** pour voir les précisions sur les erreurs.
4. Si la vérification de l'alignement échoue, résolvez l'erreur comme suit.
 - a. Sélectionnez **Reload (Recharger)**, puis sélectionnez **OK** pour confirmer le retour à l'écran Load (Charger).
 - b. Retirez tous les éléments qui se trouvent sur le dessus de l'instrument, puis sélectionnez **OK**. La poste de la Flow Cell s'ouvre.
 - c. Rechargez la Flow Cell, puis sélectionnez **Run Setup (Configuration de l'analyse)**.
 - d. Examinez chaque écran pour relire chaque RFID et retournez à l'écran Pre-Run Checks (Vérifications avant analyse).
 - e. Refaites la vérification.

Surveiller la progression de l'analyse

Les détails suivants sont affichés sur l'écran Sequencing (Séquençage) pendant que l'analyse est en cours. L'écran Sequencing (Séquençage) est accessible via le menu principal.

- **État des étapes analyses individuelles**
- **Time to completion (Fin de l'analyse)** : la date et l'heure de fin de l'analyse (au format aaaa-mm-jj hh:mm).
- **Run progress (Progression de l'analyse)** : l'étape de l'analyse en cours. La taille de la barre de progression n'est pas proportionnelle à la durée d'analyse de chaque étape.
- **Q-scores (Scores de qualité)** : la répartition des scores de qualité.
- **Intensity (Intensité)** : la valeur des intensités d'amplifiats du 90e centile pour chaque plaque. Les couleurs du tracé indiquent les canaux rouges et verts.
- **Clusters passing filter (%) (Amplifiats passant le filtre [%])** : le pourcentage d'amplifiats passant le filtre.
- **Projected Total Yield (GB) (Rendement total attendu [Gb])** : le rendement total attendu pour l'analyse de Flow Cell. Si les indicateurs par ligne sont sélectionnés (H), les nombres affichés indiquent le rendement par ligne et seront mis à jour tout le long de l'analyse à chaque cycle.
- **Q30** : le pourcentage de définitions des bases pour l'analyse qui a un score de qualité ≥ 30 .

Icônes d'état

Dans l'interface du NVOS, l'icône d'état indique l'état de l'analyse. Les chiffres affichés sur l'icône indiquent le nombre de situations pour un état.

Lorsque l'état de l'analyse change, l'icône clignote. Sélectionnez l'icône pour afficher une description de la situation. Sélectionnez **Acknowledge (Accepter)** pour effacer le message, puis **Close (Fermer)** pour fermer la boîte de dialogue.

Icône d'état	Nom de l'état	Description
	État correct	Le système est normal.
	Traitement	Le système est en cours de traitement.
	Avertissement	Un avertissement a été généré et nécessite une attention. Les avertissements n'interrompent pas l'analyse et ne nécessitent pas d'intervention.
	Erreur	Une erreur s'est produite. Les erreurs nécessitent une intervention avant la poursuite de l'analyse.
	Information	Un message non critique est disponible.

Indicateurs de l'analyse

Le logiciel affiche les indicateurs générés au cours de l'analyse. Les indicateurs s'affichent sous forme de diagrammes, de graphiques et de tableaux qui s'appuient sur des données générées par RTA3 et qui sont enregistrés dans des fichiers InterOp.

La génération d'amplifiats prend environ 2 heures, puis le séquençage démarre avec le premier cycle. Les indicateurs sont mis à jour tout au long du séquençage. Les amplifiats passant le filtre, le rendement et les scores de qualité sont disponibles après le cycle 26. Avant le cycle 26, aucune valeur ne sera affichée, les champs afficheront la mention sans objet.

Après le séquençage

Les sections suivantes fournissent des instructions sur les étapes qui se produisent une fois le séquençage terminé.

Lavage automatique après analyse

Lorsque le séquençage est terminé, le logiciel lance un lavage automatique après analyse qui prend environ 80 minutes. Le système pompe une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,24 % de la position n° 17 et la dilue à 0,12 %. La solution de NaOCl à 0,12 % est pompée vers les positions des réactifs ExAmp et des bibliothèques, à travers la Flow Cell, puis vers les flacons de réactifs usagés. Le lavage rince le système avec ce liquide afin de prévenir la contamination croisée.

Lorsque le lavage est terminé, le système est placé en état de sécurité et le bouton Home (Accueil) devient actif. Laissez les consommables en place jusqu'à l'analyse suivante. Après le lavage, les dispositifs d'aspiration demeurent dans la cartouche SBS et la cartouche d'amplification afin d'empêcher l'air d'entrer dans le système. Les dispositifs d'aspiration de la cartouche de tampon sont levés pour que les flacons de réactifs usagés puissent être vidés. Le tampon de lavage est ensuite pompé dans toutes les conduites pour éliminer le NaOCl et les réactifs du système.

REMARQUE Si une erreur se produit pendant un lavage automatique après analyse et que le lavage après analyse est incomplet, un lavage de maintenance est nécessaire.

Détacher la position n° 30

Le réservoir en position n° 30 de la cartouche d'amplification contient du formamide. Il est retiré de la cartouche d'amplification usagée et jetée séparément.



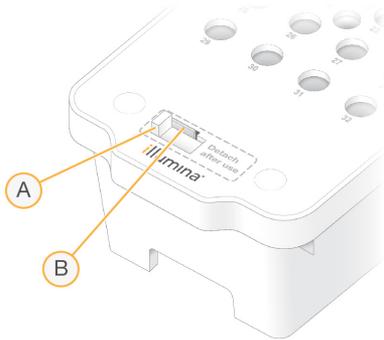
ATTENTION

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

1. Équipé de gants, appuyez sur l'onglet en plastique blanc à droite qui porte la mention **Détacher après utilisation**.
2. Placez une main ou une surface solide sous le réservoir et poussez l'onglet de plastique transparent vers l'étiquette Illumina pour éjecter le réservoir de sous la cartouche d'amplification.

REMARQUE Évitez d'empiler les cartouches d'amplifiat lors de leur entreposage. Un empilement pourrait causer un décollement accidentel du réservoir.

Figure 11 Position n° 30 amovible



- A. Onglet en plastique blanc pour détacher
- B. Onglet en plastique transparent pour éjecter

3. Mettez le réservoir au rebut conformément aux normes de sécurité en vigueur.

Sortie de séquençage

Lors du séquençage, les données sont automatiquement transférées de l'instrument NovaSeq 6000Dx vers le serveur DRAGEN Illumina. Lorsque l'analyse primaire et le transfert des données sont terminés, l'analyse secondaire sur le serveur DRAGEN Illumina peut commencer automatiquement à l'aide des options d'analyse définies par l'application sélectionnée dans Illumina Run Manager. Les résultats produits dépendent des options choisies lors de la configuration de l'analyse. Pour afficher les résultats d'une analyse, sélectionnez le nom de l'analyse souhaitée dans l'onglet Completed (Terminé) de l'écran Runs (Analyses). Vous pouvez également trouver des fichiers de sortie à l'emplacement spécifié sur l'écran Instrument Settings (Paramètres de l'instrument).

Real-Time Analysis

L'instrument NovaSeq 6000Dx exécute RTA3, une version du logiciel Real-Time Analysis, à partir de son propre moteur de calcul (CE ou Compute Engine). RTA3 extrait les intensités des images reçues de la caméra, effectue les définitions des bases, associe un score de qualité à chaque définition des bases, effectue l'alignement à PhiX et élabore les rapports dans les fichiers InterOp.

Pour optimiser le délai de traitement, RTA3 conserve les données en mémoire. Si RTA3 est arrêté, le traitement ne reprend pas et les données de l'analyse en cours de traitement dans la mémoire sont perdues.

Entrées dans RTA3

RTA3 nécessite les images des plaques contenues dans la mémoire locale du système aux fins du traitement. RTA3 reçoit l'information sur l'analyse et des commandes de NVOS.

Sorties RTA3

Les images de chaque canal de couleur passent de la mémoire à RTA3 sous forme de plaques. À l'aide de ces images, RTA3 produit un ensemble de fichiers de filtrage et de fichiers de définition des bases dont la qualité est notée. Toutes les autres données de sortie sont des données complémentaires des principaux fichiers de sortie.

Type de fichiers	Description
Fichiers de définition des bases	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier de définition des bases concaténé (*.cbcl). Les plaques de la même ligne et de la même surface sont rassemblées dans un fichier CBCL pour chacune des lignes et des surfaces.
Fichiers de filtrage	Chaque plaque produit un fichier de filtrage (*.filter) qui précise si un amplifiat a franchi les filtres.

RTA3 donne des mesures en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockées dans des fichiers InterOp, qui sont des fichiers de sortie binaires contenant des mesures relatives aux plaques, aux cycles et au niveau de lecture.

Gestion des erreurs

RTA3 crée des fichiers journaux et les enregistre dans le dossier Logs (Journaux). Les erreurs sont enregistrées dans un format de fichier texte (*.log).

Les fichiers journaux suivants sont transférés vers leur emplacement final de sortie à la fin du traitement :

- `info_00000.log` résume les activités d'analyse importantes.
- `error_00000.log` répertorie les erreurs survenues au cours d'une analyse.
- `warning_00000.log` répertorie les avertissements reçus au cours d'une analyse.

Plaques de la Flow Cell

Les plaques sont de petites zones d'imagerie sur la Flow Cell. La caméra prend une image de chaque témoin, que le logiciel divise en plaques aux fins du traitement par RTA3. Le nombre total de plaques dépend du nombre de lignes, de témoins et de surfaces qui sont imagés sur la Flow Cell.

- Les Flow Cell S2 possèdent un total de 1 408 plaques.
- Les Flow Cell S4 possèdent un total de 3 744 plaques.

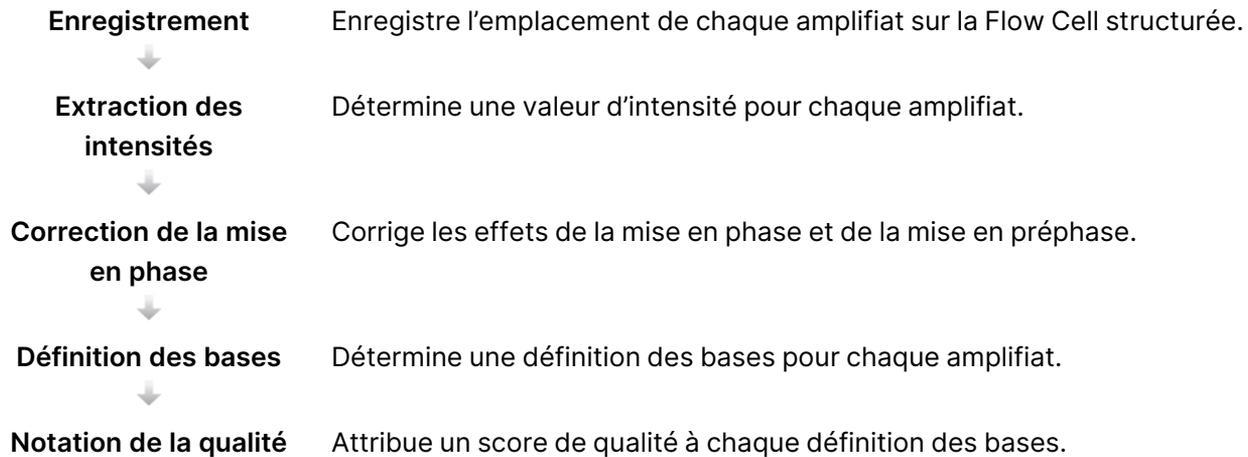
Composants de la Flow Cell	S2	S4	Description
Lignes	2	4	Une ligne est un canal physique possédant des ports d'entrée et de sortie.

Composants de la Flow Cell	S2	S4	Description
Surfaces	2	2	Les Flow Cell S2 et S4 sont imagées sur deux surfaces : les surfaces inférieure et supérieure. La surface supérieure de la plaque est imagée en premier.
Témoins par ligne	4	6	Un témoin est une colonne d'une ligne de la Flow Cell que la caméra saisie dans une seule image.
Plaques par témoin	88	78	Une plaque est une partie d'un témoin qui montre une zone imagée sur la Flow Cell.
Nombre total de plaques générées	1 408	3 744	Lignes × surfaces × témoins × plaques par témoins = nombre total de plaques.

Le numéro de la plaque est composé de cinq chiffres qui représentent la position sur la Flow Cell. Par exemple, le numéro de plaque 1_1205 indique la ligne 1, la surface du haut, le témoin 2 et la plaque 5.

- Le premier chiffre représente la ligne :
 - 1 ou 2 pour une Flow Cell S2.
 - 1, 2, 3 ou 4 pour une Flow Cell S4.
- Le deuxième chiffre représente la surface : 1 pour le haut et 2 pour le bas.
- Le troisième chiffre représente le témoin :
 - 1, 2, 3 ou 4 pour une Flow Cell S2.
 - 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 pour une Flow Cell S4.
- Les deux derniers chiffres représentent le numéro de plaque. La numérotation des plaques commence à 01 à l'extrémité de sortie de la Flow Cell et va jusqu'à 88 ou 78 à l'extrémité d'entrée.
 - 01 à 88 pour une Flow Cell S2.
 - 01 à 78 pour une Flow Cell S4.

Flux de travail de Real-Time Analysis



Enregistrement

La fonction d'enregistrement aligne une image au réseau de forme losange de nanopuits sur la Flow Cell structurée. En raison de l'arrangement ordonné des nanopuits, les coordonnées X et Y sont prédéterminées pour chaque amplifiat dans une plaque. Les positions des amplifiats de chaque analyse s'inscrivent dans un même fichier d'emplacement des amplifiats (s.locs).

S'il y a échec d'enregistrement d'une image d'un cycle, aucune définition des bases ne sera générée pour cette plaque dans ce cycle.

Extraction des intensités

Après l'enregistrement, la fonction d'extraction des intensités calcule une valeur d'intensité pour chaque nanopuits dans une image donnée. Si l'enregistrement échoue, l'intensité de la plaque ne peut pas être extraite.

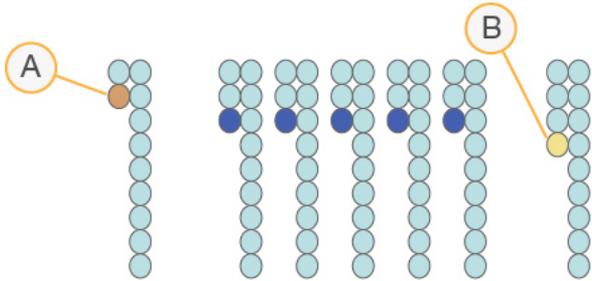
Correction de la mise en phase

Lors de la réaction de séquençage, chaque brin d'ADN dans un amplifiat s'étend d'une base par cycle. La mise en phase et la mise en préphase ont lieu lorsqu'un brin est déphasé par rapport au cycle d'incorporation en cours.

La mise en phase se produit lorsqu'un brin a un retard d'une base.

La mise en préphase se produit lorsqu'un brin a une avance d'une base.

Figure 12 Mise en phase et en préphase



- A. Lecture avec une base présentant une mise en phase
- B. Lecture avec une base présentant une mise en préphase.

RTA3 corrige les effets de la mise en phase et de la mise en préphase, ce qui maximise la qualité des données à chaque cycle tout au long de l'analyse.

Définition des bases

La définition des bases détermine une base (A, C, G ou T) pour chaque amplifiat d'une plaque donnée d'un cycle spécifique. Le Instrument NovaSeq 6000Dx utilise un séquençage à deux canaux, qui ne nécessite que deux images pour encoder les données de quatre bases d'ADN, une provenant du canal rouge et une autre du canal vert.

L'absence de définition est indiquée par la lettre N. Il n'y a aucune définition lorsqu'un amplifiat ne passe pas le filtre, que l'enregistrement échoue ou que l'amplifiat se trouve hors de l'image.

Les intensités de chaque amplifiat sont extraites de l'image rouge et de l'image verte, puis sont comparées l'une à l'autre, ce qui donne quatre populations distinctes. Chaque population correspond à une base. Le processus de définition des bases détermine à quelle population appartient chaque amplifiat.

Figure 13 Visualisation de l'intensité des amplifiats

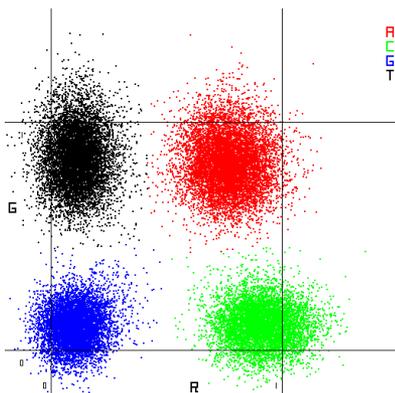


Tableau 8 Définition des bases dans le séquençage à deux canaux

Base	Canal rouge	Canal vert	Résultats
A	1 (allumé)	1 (allumé)	Amplifiats montrant une intensité tant dans le canal rouge que dans le canal vert.
C	1 (allumé)	0 (éteint)	Amplifiats montrant une intensité seulement dans le canal rouge.
G	0 (éteint)	0 (éteint)	Amplifiats ne montrant d'intensité dans aucun emplacement d'amplifiat connu.
T	0 (éteint)	1 (allumé)	Amplifiats montrant une intensité seulement dans le canal vert.

Amplifiats passant le filtre

Au cours de l'analyse, RTA3 filtre les données brutes pour supprimer les lectures non conformes au seuil de qualité des données. Les amplifiats qui se chevauchent et ceux de mauvaise qualité sont supprimés.

Dans le cas d'une analyse sur deux canaux, RTA3 utilise un système basé sur une population pour déterminer la pureté (mesure de la pureté de l'intensité) d'une définition des bases. Les amplifiats franchissent le filtre (PF) lorsqu'une définition des bases ou moins, au cours des 25 premiers cycles, a une pureté inférieure à un seuil déterminé. L'alignement PhiX est réalisé au cycle 26 dans un sous-ensemble de plaques pour les amplifiats ayant passé le filtre. Les amplifiats qui ne passent pas le filtre ne servent pas à la définition des bases et ne sont pas alignés.

Scores de qualité

Un score de qualité, ou Q-score, est une prévision de la probabilité d'une définition des bases erronée. Un score de qualité plus élevé suppose qu'une définition des bases est de plus haute qualité et plus susceptible d'être correcte. Une fois le score de qualité établi, les résultats sont enregistrés dans des fichiers CBCL.

Le score de qualité communique de manière concise les probabilités de petites erreurs. Les scores de qualités sont représentés sous la forme $Q(X)$, où X est le score. Le tableau suivant montre la relation entre le score de qualité et la probabilité d'une erreur.

Score de qualité $Q(X)$	Probabilité d'une erreur
Q40	0,0001 (1 sur 10 000)
Q30	0,001 (1 sur 1 000)
Q20	0,01 (1 sur 100)
Q10	0,1 (1 sur 10)

Scores de qualité et rapports

La notation de la qualité calcule un ensemble d'indicateurs prévisionnels pour chaque définition des bases, puis utilise ces valeurs pour rechercher un score de qualité dans un tableau de qualité. Les tableaux de qualité servent à fournir des indicateurs de qualité extrêmement précis pour des analyses générées par une configuration spécifique de plateforme de séquençage et de version de chimie.

La notation de la qualité s'appuie sur une version modifiée de l'algorithme Phred.

Afin de générer le tableau de qualité pour le Instrument NovaSeq 6000Dx, trois groupes de définitions des bases ont été déterminés, selon la génération d'amplifiats de ces fonctions prédictives spécifiques. À la suite du regroupement de ces définitions de bases, le taux d'erreur moyen est calculé empiriquement pour chacun des trois groupes et les scores Q correspondants sont enregistrés dans le tableau de qualité avec les fonctions prédictives corrélant avec ce groupe. En tant que tels, seuls trois scores de qualité sont possibles avec RTA3 et ces scores de qualité représentent le taux d'erreurs moyen du groupe. Pour résumer, ces résultats sont simplifiés, mais très justes en tant que score de qualité. Les trois groupes dans le tableau de qualité correspondent à des définitions de bases de qualité marginale (< Q15), moyenne (~Q20), et haute qualité (> Q30) et sont assignés à des scores précis de 12, 26 et 34 respectivement. De plus, un score nul de 2 est assigné à tous les « no-call » (non défini). Ce modèle de rapport sur les scores de qualité réduit les besoins d'espace de stockage et de bande passante sans nuire à la précision ni à la performance.

Figure 14 Simplification du score de la qualité avec RTA3



Fichiers de sortie de séquençage

Type de fichiers	Description, emplacement et nom des fichiers
Fichiers de définition des bases	Chaque amplifiat analysé est compris dans un fichier de définition des bases ; ces fichiers sont rassemblés dans un fichier pour chaque cycle, chaque ligne et chaque surface. Le fichier rassemblé contient la définition des bases ainsi que le score de qualité codé associé à chaque amplifiat. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, par exemple L001_1.cbcl
Fichiers d'emplacement des amplifiats	Pour chaque Flow Cell, un fichier d'emplacement des amplifiats binaire comprend les coordonnées XY des amplifiats sur la plaque. Une disposition hexagonale qui concorde avec l'emplacement des nanopuits de la Flow Cell prédéfinit les coordonnées. Data\Intensities s_[lane].locs
Fichiers de filtrage	Le fichier de filtrage spécifie si un amplifiat a franchi les filtres. Les fichiers de filtrage sont générés au cycle 26 et portent sur 25 cycles de données. Un fichier de filtrage est généré pour chaque plaque. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Fichier de renseignements sur l'analyse	Indique le nom de l'analyse, le nombre de cycles à chaque lecture, si la lecture est une lecture d'index et le nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell. Le fichier de renseignements sur l'analyse est créé au début de l'analyse. [Root folder], RunInfo.xml
Fichiers des miniatures	Images de miniatures du premier cycle de chaque séquençage. Thumbnail_Images\L001\C[X.1] : les fichiers sont stockés dans un sous-dossier pour chaque cycle. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg : l'image miniature comprend le numéro de la plaque.

Structure des dossiers de sortie de séquençage

Le NVOS génère automatiquement le nom du dossier de sortie.

 **Config** : paramètres de configuration de l'analyse.

 **Logs** : fichiers journaux décrivant les étapes de fonctionnement, les étapes des analyses sur l'instrument et les événements de RTA3.

 SampleSheet.csv : feuille d'échantillon ou autre fichier joint, le cas échéant.

 **Data (Données)**

 **Intensities (Intensités)**

 **BaseCalls (Définitions de bases)**

L00[X] : fichiers de définition des bases (*.cbcl), rassemblés dans un fichier par ligne, par surface et par cycle.

s.locs : fichier d'emplacement des amplifiats de l'analyse.

InterOp : fichiers binaires.

Recipe (Formule) : fichier de formule propre à l'analyse.

Thumbnail Images (Images miniatures) : images miniatures générées après chaque tranche de 10 plaques.

LIMS : fichier de configuration (*.json), s'il y a lieu.

Audit

AuditInfo.xml

RTA3.cfg

RunInfo.xml

RunParameters.xml

RTAComplete.txt

CopyComplete.txt

SequenceComplete.txt

IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

Manifest.tsv

Avertissements et Précautions



ATTENTION

La loi fédérale réserve la vente de cet appareil par ou sur l'ordre d'un médecin ou d'un autre praticien autorisé par la loi de l'État dans lequel il exerce, à utiliser ou à ordonner l'utilisation de l'appareil.

- **Certains composants des réactifs fournis par Illumina pour être utilisés avec le Instrument NovaSeq 6000Dx contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire adaptés au risque d'exposition. Manipuler les réactifs usagés comme des déchets chimiques et les mettre au rebut conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, reportez-vous à la fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.**
- Le défaut de suivre les procédures, telles que spécifiées, peut causer des résultats erronés ou une diminution significative de la qualité de l'échantillon.

- Prendre les précautions de routine en laboratoire. Ne pas injecter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées. Porter des gants à usage unique et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des spécimens et des réactifs du kit. Se laver correctement les mains après avoir manipulé les spécimens et les réactifs du kit.
- Des pratiques de laboratoire adéquates et une bonne hygiène de laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, l'instrument et les échantillons d'ADN génomiques. La contamination par PCR peut causer des résultats inexacts et peu fiables.
- Pour empêcher la contamination, s'assurer que les zones de pré- et post-amplification sont équipées de l'équipement et des consommables nécessaires (p. ex., les pipettes, les blocs chauffant, les vortex et les centrifugeuses).
- L'appariement index-échantillon doit correspondre exactement à la disposition du plateau imprimé. L'application DNA Prep with Enrichment inscrit automatiquement les primers d'index associés au nom de chaque échantillon lorsque ces derniers sont entrés lors de la configuration de l'analyse. Il est recommandé de vérifier les primers d'indexation associés aux échantillons avant de commencer le séquençage. Le mauvais placement de l'échantillon par rapport à la disposition du plateau cause une diminution d'identification des échantillons positifs et un signalement incorrect des résultats.
- L'installation d'un logiciel antivirus fourni par l'utilisateur est fortement recommandée pour protéger l'ordinateur des virus.
- Ne pas utiliser le NovaSeq 6000Dx si l'un des panneaux est retiré. L'utilisation de l'instrument avec l'un des panneaux retiré crée une exposition potentielle aux tensions secteur et CC.
- Ne pas toucher la platine de Flow Cell dans le compartiment de la Flow Cell. Le chauffage de ce compartiment fonctionne à des températures comprises en 22 °C et 95 °C et peut causer des brûlures.
- L'instrument pèse environ 480 kg (1 059 lbs) et peut causer de graves blessures s'il tombe et n'est pas manipulé correctement.

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performance de NovaSeq 6000Dx ont été établies en utilisant le Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pour la préparation des bibliothèques, la NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et la NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) pour le séquençage et l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pour l'analyse secondaire, y compris la détection des variants germinaux et somatiques. Les études comprenaient l'indexage des échantillons, la contamination par transfert entre échantillons, l'entrée d'ADN, la sensibilité analytique (limite de blanc et limite de détection), l'exactitude, la précision, la comparaison des méthodes et la reproductibilité. Consultez la *Notice pour Illumina DNA Prep with Enrichment Dx* pour connaître les caractéristiques de performance liées aux facteurs préanalytiques, comme les méthodes d'extraction ou les substances interférentes.

Définitions des calculs utilisés dans les caractéristiques de performances

1. Le pourcentage de concordance positive (PCP) est calculé comme le pourcentage de loci classés comme variants par une méthode de référence qui sont correctement signalés par l'analyse.
 - $(\text{nombre de loci avec variant signalés par l'analyse}) / (\text{nombre total de loci avec variant})$Les loci avec variant signalés par le séquençage qui correspondent à la méthode de référence sont des vrais positifs (VP). Les loci avec variant signalés comme définitions de référence ou définitions de variants différents sont des faux négatifs (FN).
2. Le pourcentage de concordance négative (PCN) est calculé comme le pourcentage de loci classés comme sauvages par une méthode de référence qui sont correctement signalés par l'analyse.
 - $(\text{nombre de loci sauvages signalés par l'analyse}) / (\text{nombre total de loci sauvages})$Les loci sauvages signalés par l'analyse qui correspondent à la méthode de référence sont des vrais négatifs (VN). Les loci sauvages signalés comme variants par l'analyse sont des faux positifs (FP).
3. Le pourcentage de concordance globale (PCG) est calculé comme le pourcentage de loci correctement signalés par l'analyse par rapport à une méthode de référence.
 - $((\text{nombre de loci avec variant signalés par l'analyse}) + (\text{nombre de loci sauvages correctement signalés par l'analyse})) / ((\text{nombre total de loci avec variant}) + (\text{nombre total de loci sauvages}))$
4. Les calculs du PCP, PCN et PCG ne comprennent pas les sans définitions (loci avec variant ou de référence ne répondant pas à un ou plusieurs filtres de qualité).
5. Le pourcentage de définitions positives (PPC) est le nombre d'observations avec le variant détecté divisé par le nombre total d'observations testées à l'exclusion de toute observation invalide ou de celles filtrées comme faible profondeur.
6. Le pourcentage de définitions négatives (PNC) est calculé comme le nombre d'observations avec une référence de passage comme résultat à une position divisé par le nombre total d'observations testées à l'exclusion de toute observation invalide ou de celles filtrées comme faible profondeur.
7. Le pourcentage de capacité d'appel autosomique est calculé comme le pourcentage de positions de référence non N dans les régions ciblées des chromosomes autosomiques avec un appel de génotype passant.

Indexation des échantillons

Les primers d'index de l'échantillon, ajoutés pendant la préparation des bibliothèques, attribuent une séquence unique à chaque échantillon d'ADN. Ces séquences uniques permettent le regroupement de multiples échantillons dans une seule analyse de séquençage. L'indexation des échantillons a été testée pour les flux de travail germinaux et somatiques. L'objectif de cette étude était d'établir le nombre d'échantillons minimal (12) et maximal (192) pouvant être traités lors d'une seule analyse de séquençage par le Instrument NovaSeq 6000Dx. Douze échantillons uniques d'ADN de Platinum Genome (NA12877–NA12888) ont été analysés avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexation par échantillon. Les bibliothèques d'échantillons ont été

préparées avec un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 1 970 505 bases à travers les 23 chromosomes humains. Les résultats d'analyse des échantillons provenant de quatre analyses de séquençage utilisant le flux de travail de génération d'analyse FASTQ et VCF pour les variants germinaux de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ont été comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0.

Pour la première série d'analyses, 192 bibliothèques d'échantillons à index unique ont été séquencées en deux analyses de séquençage, une avec les réactifs S2 et l'autre avec les réactifs S4, pour vérifier le nombre maximal d'index pris en charge et la capacité du test à faire systématiquement un appel de génotypage pour un échantillon donné sur différentes combinaisons de primers d'indexage. Pour la deuxième série d'analyses, douze bibliothèques d'échantillons à index unique ont été séquencées en deux analyses de séquençage, avec les réactifs S2 et S4 respectivement, afin de vérifier le nombre minimal d'index pris en charge.

Dans le cas des analyses de 192 index, la PCP pour les SNV allait de 99,7 % à 100 %, la PCP pour les insertions était de 100 %, la PCP pour les délétions allait de 96,7 % à 100 % et la PCN était de 100 %. Dans le cas des analyses de 12 index, la PCP pour les SNV allait de 99,7 % à 100 %, la PCP pour les insertions allait de 89,6 % à 100 %, la PCP pour les délétions allait de 94,6 % à 100 % et la PCN était de 100 %.

Contamination par transfert entre échantillons

Le Instrument NovaSeq 6000Dx permet le séquençage de multiples échantillons et contrôles dans une seule analyse de séquençage. Une étude a été menée pour évaluer l'étendue de la contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage et entre les analyses de séquençage. Douze échantillons d'ADN de Platinum Genome, six mâles et six femelles, ont été testés au moyen d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 1 970 505 bases sur 23 chromosomes différents, y compris les deux chromosomes sexuels. Les bibliothèques ont été séquencées sur le Instrument NovaSeq 6000Dx à l'aide du flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour les variants germinaux de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. La contamination par transfert des échantillons mâles aux échantillons femelles a été observée par la présence de lectures de cibles du chromosome Y dans les échantillons femelles.

La contamination par transfert entre échantillons réalisé au cours d'une analyse de séquençage peut survenir au cours de la génération d'amplifiats, de la définition des bases du cycle de l'index et du démultiplexage des échantillons. Pour tester la contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage, un regroupement de bibliothèques composé de douze réplicats d'échantillons mâles et femelles et de deux contrôles négatifs pour un total de 192 bibliothèques à index unique, a été séquencé sur le Instrument NovaSeq 6000Dx au cours de deux analyses de séquençage avec les réactifs S2 et S4. La contamination par transfert entre échantillons au cours d'une analyse de séquençage a été évaluée par la comparaison de la couverture des cibles du chromosome Y de chaque réplicat femelle avec la couverture moyenne des cibles du chromosome Y de tous les réplicats mâles du regroupement. Le 95^e centile de contamination par transfert entre échantillons observé était de 0,0090 % et de 0,041 % pour les réactifs S2 et S4, respectivement.

Pour tester la contamination par transfert entre échantillons entre les analyses de séquençage, deux regroupements de bibliothèques ont été préparés et séquencés de façon consécutive sur une Instrument NovaSeq 6000Dx, avec le côté A utilisant les réactifs S4 et le côté B, les réactifs S2. Le premier regroupement contenait douze réplicats de six échantillons femelles uniques, plus deux contrôles négatifs, pour un total de 96 bibliothèques

à index unique. Le deuxième regroupement contenait douze réplicats de six échantillons mâles uniques, plus deux contrôles négatifs, pour un total de 96 librairies à index unique. Les deux regroupements ont utilisé le même ensemble d'adaptateurs d'index. Le regroupement des échantillons femelles a été séquencé en premier, suivi de l'analyse de séquençage du regroupement des échantillons mâles, puis d'une autre analyse de séquençage du regroupement des échantillons femelles. La contamination par transfert entre échantillons entre les analyses de séquençage a été évaluée par type de réactifs, S2 et S4 en comparant la couverture cible du chromosome Y entre les réplicats correspondant de la deuxième analyse de séquençage du regroupement des échantillons femelles et de l'analyse de séquençage du regroupement des échantillons mâles. Le 95^e centile de contamination par transfert entre échantillons entre les analyses observé était de 0,0089 % et de 0,012 % pour les réactifs S2 et S4, respectivement.

Entrée d'ADN

Sang (variant germinal)

La plage d'entrées d'ADN sanguin pour la trousse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx avec l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a été établie pour le NovaSeq 6000Dx. Cette plage a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série au moyen de 8 échantillons d'ADN de Platinum Genome (NA12877 - NA12884) et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 1 970 505 bases sur les 23 chromosomes humains. La librairie a été séquencée sur un Instrument NovaSeq 6000Dx avec un lot de la NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et la NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles).

Sept échantillons ont été testés en double exemplaire à six niveaux d'entrée d'ADN allant de 1 000 ng à 10 ng (1 000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, et 10 ng). Un huitième échantillon (NA12884) a été testé dans un seul réplicat à une entrée de 10 ng et en double pour chaque autre niveau d'entrée. Pour la détermination de la précision, les génotypes des échantillons ont été comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats ont été déterminés pour chaque niveau d'entrée. Le PCP pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions) est présenté dans le tableau [Résultats du PCP pour chaque niveau d'entrée d'ADN par type de variant à la page 35](#). Le PCN est présenté dans le tableau [PCN pour chaque niveau d'entrée d'ADN à la page 35](#). Tous les niveaux d'entrée ont affiché une précision similaire. Le niveau d'entrée d'ADN recommandé pour la trousse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est 50 - 1 000 ng, avec 1 000 ng et 10 ng représentant les limites inférieures et supérieures permettant de respecter les caractéristiques de performance lors du séquençage sur le NovaSeq 6000Dx.

Tableau 9 Résultats du PCP pour chaque niveau d'entrée d'ADN par type de variant

Entrée d'ADN (ng)	Type de variant	Variants prévus	TP	FN	Absence de définition de variant	PCP (%)
10	SNV	69612	69538	68	6	99,9
25		74192	74105	75	12	99,9
50		74105	74	13	99,9	
100		74116	72	4	99,9	
250		74113	72	7	99,9	
1000		74112	73	7	99,9	
10	Insertion	2732	2732	0	0	100
25		2928	2916	6	6	99,8
50		2914	8	6	99,7	
100		2917	6	5	99,8	
250		2928	0	0	100	
1000		2921	5	2	99,8	
10	Délétion	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50		2207	3	30	99,9	
100		2199	1	40	> 99,9	
250		2201	0	39	100	
1000		2195	2	43	99,9	

Tableau 10 PCN pour chaque niveau d'entrée d'ADN

Entrée d'ADN (ng)	TN	FP	Absence de définition dans la référence	PCN (%)
10	115449045	384	285751	> 99,9
25	123012157	415	438153	> 99,9
50	122985299	369	465043	> 99,9
100	122976660	321	473730	> 99,9
250	122971099	331	479289	> 99,9
1000	122978527	324	471882	> 99,9

FFPE (variant somatique)

La plage d'entrées d'ADN provenant de tissus fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE) pour la trousse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx avec l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a été établie pour l'instrument NextSeq 550Dx. Cette plage a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série au moyen de deux échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 1 970 505 bases sur les 23 chromosomes humains. La librairie a été séquencée sur un Instrument NovaSeq 6000Dx avec un lot de la NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et la NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles).

L'échantillon d'ADN GM12877 a été dilué avec l'échantillon d'ADN GM12878 afin de créer les échantillons GM12877-13 et GM12877 en tant qu'un ensemble de variants hétérozygotes uniques dont la fréquence des variants est d'environ 6,5 % et 13 %. L'échantillon non dilué GM12877 a également été testé. L'échantillon GM12877-13 a été testé en double exemplaire à quatre niveaux d'entrée d'ADN allant de 1 000 ng à 25 ng (1 000 ng, 250 ng, 50 ng, et 25 ng). L'échantillon GM12877 a été testé dans un seul réplicat à une entrée de 250 ng et en double pour chaque autre niveau d'entrée. Pour la détermination de la précision, les définitions des variants des échantillons ont été comparées aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0. Les résultats ont été déterminés pour chaque niveau d'entrée. Le PCP pour chaque type de variant (SNV, insertions et délétions) est présentée dans le tableau [Résultats du PCP pour chaque niveau d'entrée d'ADN FFPE par type de variant et FAV cible à la page 36](#). Le PCN est présenté dans le tableau [PCN pour chaque niveau d'entrée d'ADN FFPE à la page 37](#). Tous les niveaux d'entrée ont affiché une précision similaire. Pour les échantillons FFPE avec une valeur $\Delta Cq \leq 5$, le niveau d'entrée d'ADN recommandé pour la trousse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est 50 - 1 000 ng, avec 1 000 ng et 25 ng représentant les limites inférieures et supérieures permettant de respecter les caractéristiques de performance lors du séquençage sur le NovaSeq 6000Dx.

Tableau 11 Résultats du PCP pour chaque niveau d'entrée d'ADN FFPE par type de variant et FAV cible

Dilution cible - FAV											
Entrée d'ADN (ng)	Type de variant	Variants prévus	0,065				0,13				
			TP	FN	Absence de définition de variant	PCP (%)	Variants prévus	TP	FN	Absence de définition de variant	PCP (%)
25	SNV	3000	2931	8	61	99,7	624	624	0	0	100
50		3000	2930	8	62	99,7	624	622	0	2	100
250		3000	2927	8	65	99,7	624	624	0	0	100
1000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100
25	Insertion	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
1000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
25	Délétion	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Tableau 12 PCN pour chaque niveau d'entrée d'ADN FFPE

Entrée d'ADN (ng)	Type sauvage attendu	TN	FP	Absence de définition dans la référence	PCN (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	> 99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	> 99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	> 99,9
1000	29030903	29030596	307	1822781	> 99,9

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

Cette étude a été menée afin d'évaluer la limite de blanc (LB) et la limite de détection (LD) pour le module de génération d'analyse des variants somatiques FASTQ et VCF de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sur le Instrument NovaSeq 6000Dx. L'étude a été réalisée avec un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 1 970 505 bases à travers les 23 chromosomes humains. Les lignées cellulaires GM12878 et GM12877 de Platinum Genome ont été fixées au formol et imprégnées à la paraffine avant d'en extraire l'ADN. Des dilutions de GM12877 avec GM12878 ont été préparées pour faire des échantillons composés de 0 %, 4 %, 6,5 % et 13 % de GM12877 en volume, afin que les fréquences de variants de 489 variants uniques de GM12877 (454 SNV, 17 insertions et 18 délétions) varient entre 0 et 0,13. Les bibliothèques d'échantillons ont été préparées à l'aide de deux lots de trousse de réactifs Illumina DNA Prep with Enrichment Dx et séquencées sur six jours consécutifs avec deux Instrument NovaSeq 6000Dx et deux lots de NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles), pour un total de douze séquençages. Il en a résulté 288 observations pour chaque variant dans chaque dilution de l'échantillon. Les LB et LD ont été calculées grâce à l'approche classique prévue dans CLSI EP17-A2. La LB et la LD ont été calculées pour les réactifs S2 et S4 séparément en regroupant les fréquences de variants de tous les variants dans le séquençage pour chaque type de réactif. L'erreur de Type I a été définie à 0,01 et l'erreur de Type II a été définie à 0,05.

La LB a été évaluée pour 489 loci indépendamment sur deux lots de séquençage pour chaque type de réactif (S2 ou S4) et préparation de bibliothèque. Pour les réactifs S2, la LB au 95e centile était de 2,9 %. Pour les réactifs S4, la LB au 95e centile était de 2,2 %.

La LD a été calculée avec succès pour 478 des 489 variants pour S2 et 485 des 489 variants pour S4. Les variants pour lesquels aucune LD n'a été déterminée pour une ou les deux préparations de bibliothèques ont été exclus de l'attribution finale de la LD pour le système NovaSeq 6000Dx. La LD du système NovaSeq 6000Dx avec les réactifs S2 et S4 a été déterminée en prenant le 95e centile des LD des variants individuels. Pour les réactifs S2, le 95e centile sur les LD de 478 variants était de 4,8 %. Pour les réactifs S4, le 95e centile sur les LD de 485 variants était de 3,9 %.

Précision

Variant germinale

L'étude suivante a été menée pour évaluer la précision de la définition de variant de la génération d'analyse de flux de travail échantillons Germline FASTQ et VCF de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sur le Instrument NovaSeq 6000Dx à l'aide du NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles). Quatre échantillons uniques d'ADN de Platinum Genome ont été testés à l'aide d'un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 1 970 505 bases (9 232 cibles) sur les 23 chromosomes humains. Chacun des échantillons a été testé douze fois, à l'exception de l'échantillon NA12880, qui a été testé en onze réplicats. Un total de 18 analyses ont été effectuées au moyen de trois instruments de séquençage, trois lots de réactifs S2 et deux opérateurs au cours d'une période de six jours. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les délétions en comparant les résultats aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0.

Tableau 13 Résumé de la concordance des variants germinaux

Critère	Observations totales ¹	Résultat en fonction de l'observation ²	Résultat en fonction de l'analyse ³
PCP pour les SNV	846	99,8	99,9
PCP pour les insertions	846	97,9	> 99,9
PCP pour les délétions	846	96,9	99,9
PCN	846	> 99,9	> 99,9
PCG	846	> 99,9	> 99,9

¹Calculées en fonction du nombre d'échantillons par analyse (47) x nombre d'analyses (18) = 846.

²Valeur la plus faible observée par réplicat d'échantillon lors des 18 analyses.

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

[Concordance germinale par échantillon à la page 39](#) contient les données de l'étude présentées avec le pourcentage de concordance positive et négative par échantillon, où les résultats des variants sont comparés aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0 pour le calcul du PCP. Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Parce que la méthode de référence fournit uniquement les résultats pour les variants mononucléotidiques et les insertions/délétions, les résultats de la base non-variante sont comparés à la séquence du génome humain de référence hg19 pour les calculs du PCN.

Tableau 14 Concordance germinale par échantillon

Échantillon	Appelabilité de l'autosome	Variants prévus ¹	TP	FN	Absence de définition de variant	TN	FP	PCP	PCN	PCG
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	> 99,9	> 99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	> 99,9	> 99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	> 99,9	> 99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	> 99,9	> 99,9

¹ Nombre total de variants dans tous les réplicats d'échantillons des 18 analyses.

[Concordance des variants germinaux, par échantillon, par type de variant à la page 39](#) montre les données de l'étude présentées par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée. La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant : les SNV, les insertions et les délétions. Les positions de référence sont exclues.

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

Échantillon	SNV			Insertions			Délétions		
	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN
NA12877	255096	254877	219	10368	10367	1	8208	8208	0
NA12878	250344	250077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246024	246024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229482	229086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

Les échantillons ont également été analysés pour définir des petites insertions et délétions (indels). Un résumé global est présenté dans le [Résumé de la détection des indels germinaux à la page 39](#). Il y avait un total de 210 indels dont la taille variait de 1 à 18 pb pour les insertions et de 1 à 21 pb pour les délétions.

Tableau 16 Résumé de la détection des indels germinaux

Type de variant	Variants prévus	TP	FN	Absence de définition de variant	PCP
Insertion	36954	36953	1	0	> 99,9
Délétion	29358	28986	16	356	99,9

Le test représentatif portait sur 9 232 cibles couvrant une variété de contenu génomique. La teneur en GC des cibles allait de 0,20 à 0,86. Les cibles comprenaient également des répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucléotides. Les données compilées par chromosome de façon à déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage de définitions exactes sont présentées dans le tableau [Variants germinaux : Précision au niveau du chromosome à la page 40](#). Le pourcentage de définitions exactes se rapporte aux définitions de variants et aux définitions de référence et est inférieur à 100 % en cas de définitions inexactes ou d'absences de définition.

Tableau 17 Variants germinaux : Précision au niveau du chromosome

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinucléotide (22), Trinucléotide (8), Insertion (18), Délétion (4)	[0,22 - 0,8]; Médiane : 0,51	114888718	34	966860	> 99,9	0,83
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinucléotide (22), Trinucléotide (8), Insertion (5), Délétion (2)	[0,24 - 0,81]; Médiane : 0,44	132293464	798	460345	> 99,9	0,35

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinucléotide (12), Trinucléotide (6), Insertion (11), Délétion (1)	[0,25 - 0,86]; Médiane : 0,45	114625053	2	226461	> 99,9	0,20
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinucléotide (5), Trinucléotide (5), Insertion (2), Délétion (2)	[0,27 - 0,77]; Médiane : 0,45	61872303	0	66741	100	0.11

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucléotide (10), Trinucléotide (8), Insertion (8), Délétion (18)	[0,29 - 0,79]; Médiane : 0,46	75314497	912	153061	> 99,9	0,20
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinucléotide (18), Trinucléotide (11), Insertion (4), Délétion (2)	[0,24 - 0,79]; Médiane : 0,48	103412695	1	182361	> 99,9	0,18

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucléotide (31), Trinucléotide (5), Insertion (1), Délétion (4)	[0,2 - 0,77]; Médiane : 0,46	132534074	19	246884	> 99,9	0,19
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (9), Insertion (4), Délétion (1)	[0,26 - 0,78]; Médiane : 0,47	56247612	411	170925	> 99,9	0,30

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinucléotide (9), Trinucléotide (9), Insertion (4), Délétion (1)	[0,27 - 0,83]; Médiane : 0,49	72650800	20	241991	> 99,9	0,33
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinucléotide (16), Trinucléotide (6), Insertion (1), Délétion (1)	[0,23 - 0,78]; Médiane : 0,44	55539058	1	188216	> 99,9	0,34

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucléotide (26), Trinucléotide (7), Insertion (2), Délétion (2)	[0,28 - 0,8]; Médiane : 0,47	75744222	742	259258	> 99,9	0,34
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinucléotide (7), Trinucléotide (7), Insertion (1), Délétion (5)	[0,26 - 0,77]; Médiane : 0,49	99972530	1	542005	> 99,9	0,54

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucléotide (6), Trinucléotide (8), Insertion (14), Délétion (0)	[0,28 - 0,79]; Médiane : 0,42	48503179	1	45666	> 99,9	0,09
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinucléotide (6), Trinucléotide (6), Insertion (4), Délétion (1)	[0,29 - 0,77]; Médiane : 0,47	22286153	198	147895	> 99,9	0,66

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinucléotide (8), Insertion (4), Délétion (6)	[0,29 - 0,76]; Médiane : 0,46	43600279	0	99041	100	0,23
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (10), Insertion (15), Délétion (21)	[0,3 - 0,76]; Médiane : 0,54	65490245	16	1438278	> 99,9	2,15

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucléotide (13), Trinucléotide (6), Insertion (18), Délétion (16)	[0,28 - 0,82]; Médiane : 0,49	97929929	417	335905	> 99,9	0,34
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinucléotide (10), Insertion (4), Délétion (0)	[0,22 - 0,78]; Médiane : 0,44	15967171	312	42077	> 99,9	0,26

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (7), Insertion (2), Délétion (21)	[0,33 - 0,83]; Médiane : 0,59	85642066	3	678213	> 99,9	0,79
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinucléotide (9), Insertion (5), Délétion (0)	[0,31 - 0,84]; Médiane : 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinucléotide (5), Insertion (2), Délétion (5)	[0,22 - 0,78]; Médiane : 0,52	25319736	50	57434	> 99,9	0,23

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (6), Insertion (6), Délétion (0)	[0,27 - 0,74]; Médiane : 0,51	30258131	0	42673	100	0,14
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinucléotide (5), Trinucléotide (23), Insertion (3), Délétion (0)	[0,2 - 0,72]; Médiane : 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertion (0), Délétion (0)	[0,4 - 0,59]; Médiane : 0,45	0	0	0	S.O.	S.O.

Les résultats du séquençage pour l'échantillon NA12878 ont été comparés à un génotype très sûr pour NA12878, établi par le National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Sur les 9 232 cibles, 8 009 cibles se trouvaient entièrement dans les zones génomiques très sûres, 776 cibles se chevauchaient en partie, et 447 cibles ne se chevauchaient pas dans la séquence NIST. Cela a résulté en 1 831 483 coordonnées par réplique pour la comparaison. Les définitions de bases non-variants ont été comparés à la séquence de référence du génome humain hg19. Les résultats sur la précision sont affichés dans le tableau [Concordance des variants germinaux pour l'échantillon NA12878 avec la base de données NIST à la page 51](#).

Tableau 18 Concordance des variants germinaux pour l'échantillon NA12878 avec la base de données NIST

Échantillon	Nbr de cibles couvertes	Appelabilité de l'autosome	TP	FN	TN	FP	PCP	PCN	PCG
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	> 99,9	> 99,9	> 99,9

D'après les données fournies par les 18 analyses de cette étude germinale, le Instrument NovaSeq 6000Dx peut séquencer ce qui suit de façon uniforme :

- Teneur en GC ≥ 20 % (toutes les bases définies dans 1 692 régions cibles séquencées avec une teneur en GC de 20 % définis correctement avec un taux sans définitions de 0 %)
- Teneur en GC ≤ 86 % (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec une teneur en GC de 86 % définis correctement avec un taux sans définitions de 0 %)
- Longueurs de PolyA ≤ 46 (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec 46 répétitions de PolyA définies correctement avec un taux sans définitions de 0,27 %)
- Longueurs de PolyT ≤ 40 (13 384 074 bases définies sur 13 384 321 dans 846 régions cibles séquencées avec 40 répétitions de PolyT définies correctement avec un taux sans définitions de 0,26 %)
- Longueurs de PolyG ≤ 11 (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec une 11 répétitions de PolyG définies correctement avec un taux sans définitions de 0 %)
- Longueurs de PolyC ≤ 8 (9 815 030 bases définies sur 9 815 035 dans 5 922 régions cibles séquencées avec 8 répétitions de PolyC définies correctement avec un taux sans définitions de 0,53 %)
- Les longueurs de répétitions de dinucléotides $\leq 31x$ (32 233 922 bases définies sur 32 233 926 dans 846 régions cibles séquencées avec 31 répétitions de dinucléotides définies. correctement avec un taux sans définitions de 0,21 %)
- Les longueurs de répétitions de trinuécléotides $\leq 23x$ (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec 23 répétitions de trinuécléotides définies correctement avec un taux sans définitions de 0,21 %)

- Longueurs d'insertion ≤ 18 (toutes les bases définies dans 1 692 régions cibles séquencées avec une 18 répétitions d'insertion définies correctement avec un taux sans définitions de 7,71 %)
- Longueurs délétion ≤ 21 (toutes les bases définies dans 1 692 régions cibles séquencées avec une 21 répétitions de délétion définies correctement avec un taux sans définitions de 1,14 %)

Variant somatique

L'étude décrite ici a servi à évaluer la précision de la définition de variants de la génération d'analyse de flux de travail Somatic FASTQ et VCF de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sur le Instrument NovaSeq 6000Dx à l'aide du NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles).

L'étude a utilisé un test représentatif conçu pour demander une variété de gènes couvrant 1 970 505 bases (9 232 cibles) à travers les 23 chromosomes humains. L'ADN de Platinum Genome a été extrait de blocs traités au FFPE pour générer quatre échantillons uniques aux fins de l'évaluation dans le cadre de l'étude.

L'échantillon d'ADN GM12877 a été dilué avec l'échantillon d'ADN GM12878 afin de créer les échantillons GM12877-13 et GM12877 en tant qu'un ensemble de variants hétérozygotes uniques dont la fréquence des variants est d'environ 6,5 % et 13 %. L'échantillon d'ADN GM12878 a été dilué avec l'échantillon d'ADN GM12877 afin de créer les échantillons GM12878-13 et GM12878 en tant qu'un ensemble de variants hétérozygotes uniques dont la fréquence des variants est d'environ 6,5 % et 13 %. Les échantillons non dilués GM12877 et le GM12878 ont également été testés. Chacun des échantillons a été testé douze fois, à l'exception de l'échantillon non dilué GM12878, qui a été testé en onze réplicats. Un total de dix-huit analyses ont été effectuées au moyen de trois instruments de séquençage, trois lots de réactifs S4 et deux opérateurs au cours d'une période de six jours. La précision a été déterminée pour les SNV, les insertions et les délétions en comparant les résultats aux données de Platinum Genomes version 2016-1.0.

Tableau 19 Résumé de la concordance somatique

Critère	Nbr d'observations ¹	Résultat en fonction de l'observation ²	Résultat en fonction de l'analyse ³
PCP pour les SNV somatiques	846	99,8	98,9
PCP pour les insertions somatiques	846	100	100
PCP pour les délétions somatiques	846	100	100
PCN	846	> 99,9	> 99,9
PCG	846	> 99,9	> 99,9

¹ Calculées en fonction du nombre d'échantillons par analyse (47) x nombre d'analyses (18) = 846.

² Valeur la plus faible observée par réplicat d'échantillon lors des 18 analyses.

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

Le tableau [Concordance des variants somatiques par échantillon à la page 53](#) contient les données de l'étude présentée avec les pourcentages de concordance positive et négative sur une base « par échantillon », où les résultats de variants sont comparés à la méthode composite de référence bien définie pour les calculs du PCP. Les trois types de variants (SNV, insertions et délétions) sont combinés. Parce que la méthode de référence fournit uniquement les résultats pour les variants mononucléotidiques et les insertions/délétions, les résultats de la base non-variante sont comparés à la séquence du génome humain de référence hg19 pour les calculs du PCN.

Tableau 20 Concordance des variants somatiques par échantillon

Échantillon	Appelabilité de l'autosome	Variants prévus	TP	FN	Absence de définition de variant	TN	FP	PCP	PCN	PCG
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	> 99,9	> 99,9

[Concordance des variants somatiques, par échantillon, par type de variant à la page 53](#) montre les données de l'étude présentées par échantillon, où les résultats des variants sont comparés avec la méthode de référence composite bien caractérisée. La détection est évaluée séparément pour chaque type de variant : les SNV, les insertions et les délétions. Les positions de référence sont exclues.

Tableau 21 Concordance des variants somatiques, par échantillon, par type de variant

Échantillon	SNV			Insertions			Délétions		
	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN	Prévu	TP	FN
GM12877	89694	88488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92664	92390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97848	95901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92664	92139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

Les quatre échantillons ont également été analysés pour définir des petites insertions et délétions (indels). Un résumé global est présenté dans le [Résumé de la détection des indels somatiques à la page 54](#). Il y avait un total de 210 indels dont la taille variait de 1 à 18 pb pour les insertions et de 1 à 21 pb pour les délétions.

Tableau 22 Résumé de la détection des indels somatiques

Type de variant	Variants prévus	TP	FN	Absence de définition de variant	PCP
Insertion	11772	11772	0	0	100
Délétion	10098	9666	0	432	100

Le test représentatif portait sur 9 232 cibles couvrant une variété de contenu génomique. La teneur en GC des cibles allait de 0,20 à 0,86. Les cibles comprenaient également des répétitions de mononucléotides (p. ex., PolyA, PolyT), de dinucléotides et de trinucleotides. Les données compilées par chromosome de façon à déterminer l'effet du contenu génomique sur le pourcentage d'appels exacts sont présentées dans le tableau [Variants somatiques : Précision au niveau du chromosome à la page 54](#). Le pourcentage de définitions exactes se rapporte aux définitions de variants et aux définitions de référence et est inférieur à 100 % en cas de définitions inexactes ou d'absences de définition.

Tableau 23 Variants somatiques : Précision au niveau du chromosome

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinucléotide (22), Trinucléotide (8), Insertion (3), Délétion (0)	[0,22 - 0,8]; Médiane : 0,51	110145939	52	5642613	> 99,9	4,9

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinucléotide (22), Trinucléotide (8), Insertion (5), Délétion (1)	[0,24 - 0,81]; Médiane : 0,44	126795713	842	5850393	> 99,9	4,4
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinucléotide (12), Trinucléotide (6), Insertion (1), Délétion (1)	[0,25 - 0,86]; Médiane : 0,45	109902527	593	4889226	> 99,9	4,3

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinucléotide (5), Trinucléotide (5), Insertion (0), Délétion (1)	[0,27 - 0,77]; Médiane : 0,45	59373461	16	2517412	> 99,9	4,1
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucléotide (10), Trinucléotide (8), Insertion (8), Délétion (18)	[0,29 - 0,79]; Médiane : 0,46	72261191	723	3116981	> 99,9	4,1

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinucléotide (18), Trinucléotide (11), Insertion (0), Délétion (1)	[0,24 - 0,79]; Médiane : 0,48	98593101	687	4890221	> 99,9	4,7
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucléotide (31), Trinucléotide (5), Insertion (1), Délétion (4)	[0,2 - 0,77]; Médiane : 0,46	126913574	104	5773856	> 99,9	4,4

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (9), Insertion (4), Délétion (0)	[0,26 - 0,78]; Médiane : 0,47	53430489	175	2958909	> 99,9	5,2
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinucléotide (9), Trinucléotide (9), Insertion (0), Délétion (1)	[0,27 - 0,83]; Médiane : 0,49	69594586	74	3260257	> 99,9	4,5

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinucléotide (16), Trinucléotide (6), Insertion (0), Délétion (0)	[0,23 - 0,78]; Médiane : 0,44	53209592	90	2469444	> 99,9	4,4
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucléotide (26), Trinucléotide (7), Insertion (2), Délétion (2)	[0,28 - 0,8]; Médiane : 0,47	72291795	150	3665560	> 99,9	4,8

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinucléotide (7), Trinucléotide (7), Insertion (0), Délétion (3)	[0,26 - 0,77]; Médiane : 0,49	96109352	101	4331932	> 99,9	4,3
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucléotide (6), Trinucléotide (8), Insertion (14), Délétion (0)	[0,28 - 0,79]; Médiane : 0,42	46130028	44	2384839	> 99,9	4,9

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinucléotide (6), Trinucléotide (6), Insertion (4), Délétion (0)	[0,29 - 0,77]; Médiane : 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinucléotide (8), Insertion (4), Délétion (0)	[0,29 - 0,76]; Médiane : 0,46	41918631	184	1753300	> 99,9	4,0

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (10), Insertion (15), Délétion (21)	[0,3 - 0,76]; Médiane : 0,54	62344351	18	4540539	> 99,9	6,8
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucléotide (13), Trinucléotide (6), Insertion (18), Délétion (1)	[0,28 - 0,82]; Médiane : 0,49	93811318	414	4403622	> 99,9	4,5

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinucléotide (10), Insertion (0), Délétion (0)	[0,22 - 0,78]; Médiane : 0,44	15007653	6	990633	> 99,9	6,2
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (7), Insertion (2), Délétion (3)	[0,33 - 0,83]; Médiane : 0,59	81416722	455	4860311	> 99,9	5,6
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinucléotide (9), Insertion (5), Délétion (0)	[0,31 - 0,84]; Médiane : 0,53	26833936	7	1301905	> 99,9	4,6

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinucléotide (5), Insertion (1), Délétion (0)	[0,22 - 0,78]; Médiane : 0,52	24169250	44	1172087	> 99,9	4,6
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinucléotide (5), Trinucléotide (6), Insertion (6), Délétion (0)	[0,27 - 0,74]; Médiane : 0,51	28887217	86	1392179	> 99,9	4,6

Chromosome	Nombre de gènes	Nombre de cibles	Nombre de bases	Contenu génomique	Plage GC	Définitions correctes	Définitions incorrectes	Sans définitions	Pourcentage de définitions correctes	Pourcentage sans définitions
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinucléotide (5), Trinucléotide (23), Insertion (3), Délétion (0)	[0,2 - 0,72]; Médiane : 0,48	64231080	241	3852253	> 99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertion (0), Délétion (0)	[0,4 - 0,59]; Médiane : 0,45	0	0	0	S.O.	S.O.

Les résultats du séquençage pour l'échantillon GM12878 ont été comparés à un génotype très sûr pour NA12878, établi par le National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Sur les 9 232 cibles, 8 009 cibles se trouvaient entièrement dans les zones génomiques très sûres, 776 cibles se chevauchaient en partie, et 447 cibles ne se chevauchaient pas dans la séquence NIST. Cela a résulté en 1 831 483 coordonnées par réplique pour la comparaison. Les définitions de bases non-variants ont été comparés à la séquence de référence du génome humain hg19. Les résultats sur la précision sont affichés dans le tableau [Concordance somatique de l'échantillon GM12878 avec la base de données du NIST à la page 65](#).

Tableau 24 Concordance somatique de l'échantillon GM12878 avec la base de données du NIST

Échantillon	Nbr de cibles couvertes	Appelabilité de l'autosome	TP	FN	TN	FP	PCP	PCN	PCG
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	> 99,9	> 99,9

D'après les données fournies par les 18 analyses de cette étude somatiques, le Instrument NovaSeq 6000Dx peut séquencer ce qui suit de façon uniforme :

- Teneur en GC \geq 20 % (toutes les bases définies dans 1 692 régions cibles séquencées avec une teneur en GC de 20 % définis correctement avec un taux sans définitions de 0,34 %)
- Teneur en GC \leq 86 % (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec une teneur en GC de 86 % définis correctement avec un taux sans définitions de 4,21 %)
- Longueurs de PolyA \leq 46 (14 550 082 bases définies sur 14 550 083 dans 846 régions cibles séquencées avec 46 répétitions de PolyA définies correctement avec un taux sans définitions de 4,18 %)
- Longueurs de PolyT \leq 40 (12 833 489 bases définies sur 12 833 491 dans 846 régions cibles séquencées avec 40 répétitions de PolyT définies correctement avec un taux sans définitions de 4,37 %)
- Longueurs de PolyG \leq 11 (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec une 11 répétitions de PolyG définies correctement avec un taux sans définitions de 7,59 %)
- Longueurs de PolyC \leq 8 (9 405 604 bases définies sur 9 405 615 dans 5 922 régions cibles séquencées avec 8 répétitions de PolyC définies correctement avec un taux sans définitions de 4,68 %)
- Longueurs de répétitions de dinucléotides \leq 31x (30 996 684 bases définies sur 30 996 712 dans 846 régions cibles séquencées avec 31 répétitions de dinucléotides définies. correctement avec un taux sans définitions de 4,04 %)
- Longueurs de répétitions de trinucléotides \leq 23x (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec 23 répétitions de trinucléotides définies correctement avec un taux sans définitions de 5,39 %)
- Longueurs d'insertion \leq 18 (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec une 18 répétitions d'insertion définies correctement avec un taux sans définitions de 1,44 %)
- Longueurs de délétion \leq 21 (toutes les bases définies dans 846 régions cibles séquencées avec une 21 répétitions de délétion définies correctement avec un taux sans définitions de 7,86 %)

Précision

La précision du Instrument NovaSeq 6000Dx a été évaluée au moyen d'échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 1 970 505 bases sur 23 chromosomes différents utilisant 9 232 oligonucléotides cibles. Au total, 1 723 variants de petite taille ciblés (SNV, insertions et délétions) ont été évalués. Le test des variants germinaux comprenait onze ou douze réplicats de quatre échantillons de Platinum Genome uniques. Le test des variants somatiques comprenait onze ou douze réplicats de quatre échantillons de Platinum Genome traités FFPE à différents niveaux de FAV. Les bibliothèques d'échantillons ont été préparés à l'aide de la trousse de réactifs Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Le test a été effectué dans un site externe avec trois Instrument NovaSeq 6000Dx, trois lots de NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et deux opérateurs au cours d'une période de 6 jours. Pour chaque jour, des bibliothèques d'échantillons germinaux ont été séquencées d'un côté de l'instrument à l'aide de réactifs S2 et du flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour les variants germinaux de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, et des bibliothèques d'échantillons somatiques ont été séquencées de l'autre côté de l'instrument à l'aide de réactifs S4 et du flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour les variants somatiques de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Il en a résulté 18 Flow cell pour chacun des flux de travail germinaux et somatiques.

Variant germinale

Pour les analyses germinales, les emplacements génomiques où un variant germinale ciblé est détecté sont signalés comme positifs (variant). Pour les variants germinaux positifs attendus, les données ont été évaluées pour le taux d'absence de définition et le pourcentage de définition positif (PPC) dans chaque type de variant (SNV, insertion, délétion). Le tableau [Observations des définitions de variants germinaux au sein du laboratoire pour les résultats positifs prévus selon le type de variant à la page 67](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 25 Observations des définitions de variants germinaux au sein du laboratoire pour les résultats positifs prévus selon le type de variant

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions positives observées ²	Total des définitions évaluables	PPC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
SNV	6	980316	< 0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Insertion	0	36738	0	36738	36738	100	> 99,99	100
Délétion	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition positive défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant est détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Les emplacements génomiques où un variant ciblé n'est pas détecté sont signalés comme négatifs (type sauvage). Dans le cas des emplacements des variants germinaux négatifs prévus, les données ont été évaluées selon le taux d'absence de définition et le pourcentage de définitions négatives (PNC). Le tableau [Observations des définitions de variants germinaux au sein du laboratoire pour les résultats négatifs prévus](#) à la page 68 résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson.

Tableau 26 Observations des définitions de variants germinaux au sein du laboratoire pour les résultats négatifs prévus

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions négatives observées ²	Total des définitions évaluables	PNC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
Type sauvage	0	406170	0	406170	406170	100	> 99,99	100

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition négative défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant n'est pas détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

La contribution de chaque paramètre (instrument, lot de réactifs, jour, réplicat de librairie) pour la variabilité globale a été déterminée par une analyse des composantes de la variance en utilisant la fréquence des variants comme variable de réponse. L'écart type global avait une moyenne de 0,0370. Le plus grand contributeur à la variabilité de la fréquence des variants provenait des réplicats de préparation de la librairie, qui ont contribué à 17,1 % de la variabilité globale. Le jour a contribué à 1 %, tandis que l'instrument et le lot de réactifs ont chacun contribué à moins de 1 % de la variabilité totale [Estimations des composants de variance de précision intra-laboratoire pour les fréquences de variants des échantillons germinaux](#) à la page 68 (ET = écart type).

Tableau 27 Estimations des composants de variance de précision intra-laboratoire pour les fréquences de variants des échantillons germinaux

Composant	ET moyen	% moyen de l'ET total
Jour	0,0020	1,028
Instrument	0,0018	0,837
Lot de consommables	0,0016	0,712
Réplicat de librairie	0,0143	17,110
Total	0,0370	100

Variant somatique

Pour les analyses somatiques, les emplacements génomiques où un variant somatique ciblé est détecté sont signalés comme positifs (variant). Pour les échantillons dilués GM12877-13 et GM12878-13 avec des variants somatiques positifs prévus à une FAV comprise entre 6,5 % et 13 %, les données ont été évaluées pour le taux d'absence de définition et le taux de définitions positives exactes de chacun des types de variant (SNV,

insertion, délétion). Le tableau [Observations des définitions de variants germinaux pour les résultats positifs prévus selon le type de variant \(FAV moyenne \$\geq 6.5\%\$ et \$\leq 13\%\$ \) à la page 69](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 28 Observations des définitions de variants germinaux pour les résultats positifs prévus selon le type de variant (FAV moyenne $\geq 6.5\%$ et $\leq 13\%$)

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions positives observées ²	Total des définitions évaluables	PPC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Insertion	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Délétion	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition positive défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant est détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Les emplacements génomiques où un variant somatique ciblé n'est pas détecté sont signalés comme négatifs (type sauvage). Dans le cas des emplacements des variants germinaux négatifs prévus, les données ont été évaluées selon le taux d'absence de définition et le pourcentage de définitions négatives. Le tableau [Observations des définitions de variants somatiques intra-laboratoire pour les résultats négatifs prévus à la page 69](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 29 Observations des définitions de variants somatiques intra-laboratoire pour les résultats négatifs prévus

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions négatives observées ²	Total des définitions évaluables	PNC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
Type sauvage	0	194922	0	194919	194922	> 99,99	> 99,99	100

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition négative défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant n'est pas détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

La contribution de chaque paramètre (instrument, lot de réactifs, jour, réplicat de librairie) pour la variabilité globale a été déterminée par une analyse des composantes de la variance en utilisant la fréquence des variants comme variable de réponse. L'écart type global avait une moyenne de 0,0062. Les réplicats de préparation de librairie sont restés la source de variabilité la plus importante, représentant 50,7 % du total. Le jour, l'instrument et le lot de consommables ont contribué à moins de 1 % de la variabilité totale [Estimations des composants de variance de précision intra-laboratoire pour les fréquences de variants des échantillons somatiques à la page 70](#) (ET = écart type).

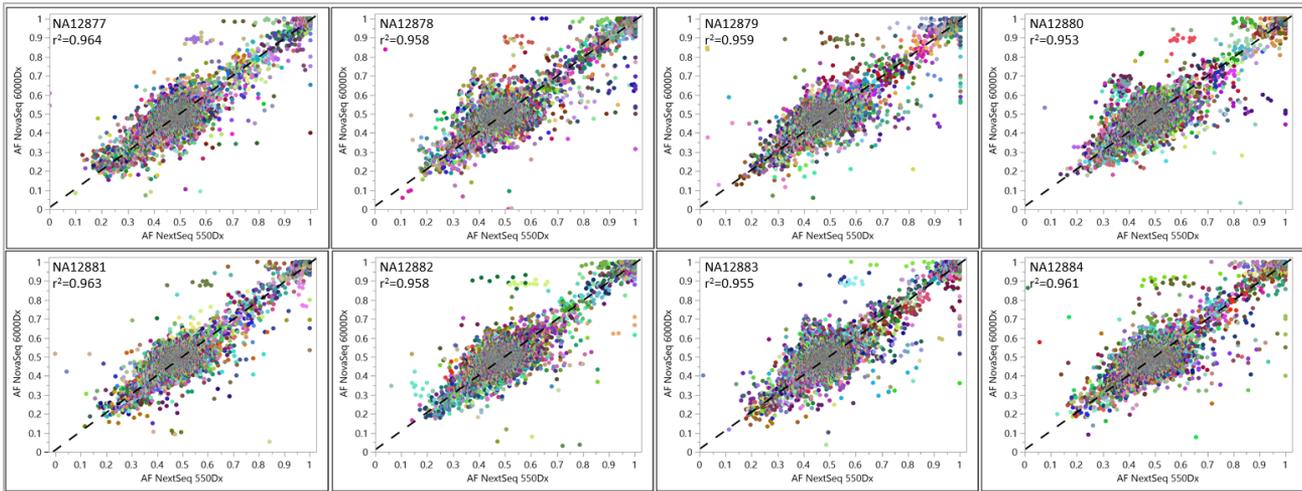
Tableau 30 Estimations des composants de variance de précision intra-laboratoire pour les fréquences de variants des échantillons somatiques

Composant	ET moyen	% moyen de l'ET total
Jour	0,0002	0,41
Instrument	0,0002	0,40
Lot de consommables	0,0002	0,35
Réplikat de librairie	0,0044	50,7
Total	0,0062	100

Comparaison des méthodes

Une étude a été réalisée pour comparer les performances entre les instruments NovaSeq 6000Dx et NextSeq 550Dx. L'accord de fréquence des variants pour les échantillons de sang a été évalué à l'aide d'un test représentatif conçu pour étudier une variété de gènes couvrant 1 970 505 bases sur les 23 chromosomes humains. Huit échantillons d'ADN de Platinum Genome ont été testés, sept en six répliquats et un (NA12881) en cinq répliquats. Les librairies ont été séquencées sur le Instrument NovaSeq 6000Dx à l'aide du flux de travail de génération d'analyse FASTQ et VCF pour le variant germlinal de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, et sur l'instrument NextSeq 550Dx à l'aide du module DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager. *Tracés de corrélation de fréquence de variant (les points sont colorés par variant unique. Les variants peuvent être colorés différemment dans chaque tracé individuel)* à la page 71 trace la corrélation FAV entre les deux instruments pour chaque échantillon. Sur la base de la forte corrélation entre Instrument NovaSeq 6000Dx et l'instrument NextSeq 550Dx, les caractéristiques de performance liées aux facteurs pré-analytiques (par exemple, les méthodes d'extraction ou les substances interférentes) sont déterminées comme étant applicables aux deux instruments. Consultez la notice du Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pour obtenir davantage de détails.

Figure 15 Tracés de corrélation de fréquence de variant (les points sont colorés par variant unique. Les variants peuvent être colorés différemment dans chaque tracé individuel)



Reproductibilité

La reproductibilité du Instrument NovaSeq 6000Dx a été évaluée au moyen d'échantillons de Platinum Genome et d'un test représentatif conçu pour étudier divers gènes couvrant 1 970 505 bases sur 23 chromosomes différents utilisant 9 232 oligonucléotides cibles. Au total, 1 723 variants de petite taille ciblés (SNV, insertions et délétions) ont été évalués. Le test des variants germinaux comprenait trois ou quatre réplicats de douze échantillons de Platinum uniques. Le test des variants somatiques comprenait cinq ou six réplicats de huit échantillons de Platinum Genome traités FFPE à différents niveaux de FAV. Les bibliothèques d'échantillons ont été préparés à l'aide de la trousse de réactifs Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Le test a été effectué sur trois sites externes avec un lot de NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cycles) et de NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cycles). Un seul instrument Instrument NovaSeq 6000Dx a été utilisé sur chaque site. Deux opérateurs ont effectué les tests sur chaque site. Chaque opérateur a réalisé les tests lors de trois jours non consécutifs pour chacun des types d'échantillons, pour un total de 36 Flow Cell sur les trois sites. Pour chaque jour, des bibliothèques d'échantillons germinaux ont été séquencées du côté A de l'instrument à l'aide de réactifs S2 et du flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour les variants germinaux de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, et des bibliothèques d'échantillons somatiques ont été séquencées sur le côté B de l'instrument à l'aide de réactifs S4 et du flux de travail de génération d'analyses FASTQ et VCF pour les variants somatiques de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Il en a résulté 18 Flow cell pour chacun des flux de travail germinaux et somatiques.

Variant germinale

Pour les analyses germinales, les emplacements génomiques où un variant germinale ciblé est détecté sont signalés comme positifs (variant). Pour les variants germinaux positifs attendus, les données ont été évaluées pour le taux d'absence de définition et le pourcentage de définition positif (PPC) dans chaque type de variant (SNV, insertion, délétion). Le tableau [Observations des définitions de variants germinaux pour les résultats](#)

[positifs prévus selon le type de variant à la page 72](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 31 Observations des définitions de variants germinaux pour les résultats positifs prévus selon le type de variant

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions positives observées ²	Total des définitions évaluables	PPC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Insertion	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Délétion	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition positive défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant est détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Les emplacements génomiques où un variant ciblé n'est pas détecté sont signalés comme négatifs (type sauvage). Dans le cas des emplacements des variants germinaux négatifs prévus, les données ont été évaluées selon le taux d'absence de définition et le pourcentage de définitions négatives (PNC). Le tableau [Observations des définitions de variants germinaux pour les résultats négatifs prévus à la page 72](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson.

Tableau 32 Observations des définitions de variants germinaux pour les résultats négatifs prévus

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions négatives observées ²	Total des définitions évaluables	PNC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
Type sauvage	0	393516	0	393516	393516	100	> 99,99	100

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition négative défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant n'est pas détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

VARIANT SOMATIQUE

Pour les analyses somatiques, les emplacements génomiques où un variant somatique ciblé est détecté sont signalés comme positifs (variant). Dans le cas des variants somatiques positifs prévus, où la fréquence moyenne des allèles des variants (FAV) est supérieure ou égale à 14 % et inférieure ou égale à 28 %, les données ont été évaluées pour le taux d'absence de définition et le taux de définitions positives exactes de chaque type de variant (SNV, insertion, délétion). Le tableau [Observations des définitions de variants](#)

[somatiques pour les résultats positifs prévus selon le type de variant \(FAV moyenne \$\geq 14\%\$ et \$\leq 28\%\$ \) à la page 73](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 33 Observations des définitions de variants somatiques pour les résultats positifs prévus selon le type de variant (FAV moyenne $\geq 14\%$ et $\leq 28\%$)

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions positives observées ²	Total des définitions évaluables	PPC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Insertion	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Délétion	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition positive défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant est détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Les emplacements génomiques où un variant somatique ciblé n'est pas détecté sont signalés comme négatifs (type sauvage). Dans le cas des emplacements des variants germinaux négatifs prévus, les données ont été évaluées selon le taux d'absence de définition et le pourcentage de définitions négatives. Le tableau [Observations des définitions de variants somatiques pour les résultats négatifs prévus à la page 73](#) résume les taux observés, ainsi que les niveaux de confiance inférieurs (NCI) et supérieurs (NCS) à 95 % calculés selon la méthode de Wilson, pour chacun des types de variant.

Tableau 34 Observations des définitions de variants somatiques pour les résultats négatifs prévus

Type de variant	Aucune définition observée ¹	Nombre total de définitions	Pourcentage sans définition	Définitions négatives observées ²	Total des définitions évaluables	PNC	NCI 95 % ³	NCS 95 %
Type sauvage	0	92718	0	92714	92718	> 99,99	99,99	100

¹ Sans définition est défini comme une position chromosomique ciblée où un variant ne peut pas être déterminé (en raison de la faible profondeur de couverture).

² Définition négative défini comme des positions chromosomiques ciblées où un variant n'est pas détecté.

³ L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Historique des modifications

Document	Date	Description de la modification
Document n° 200025276 v01	Septembre 2022	Mise à jour des données de précision pour les observations de définition des variants germinaux.

Document	Date	Description de la modification
Document n° 200025276 v00	Août 2022	Publication initiale.

Brevets et Marques

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Coordonnées



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



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

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