

Notice d'accompagnement TruSight sur la fibrose kystique

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

N° de référence 20036925 : de 1 à 4 analyses, jusqu'à 96 échantillons par trousse

Aperçu du produit

La Préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight prend en charge le test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique TruSight.

Utilisation prévue du test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight

Le test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina est un système de diagnostic *in vitro* qualitatif utilisé pour détecter simultanément 139 mutations pertinentes sur le plan clinique provoquant la fibrose kystique et pour identifier des variants du gène régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) dans l'ADN génomique isolé d'échantillons de sang entier périphérique d'origine humaine. Parmi les variants figurent ceux recommandés en 2004 par l'American College of Medical Genetics (ACMG)¹ et en 2011 par l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)². Ce test a pour but de dépister les porteurs de la maladie chez les adultes en âge de procréer. Il vise aussi à confirmer les tests de diagnostic des nouveau-nés et des enfants. Enfin, il sert de test initial pour aider à diagnostiquer les personnes probablement atteintes de fibrose kystique. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinicien détenteur d'un certificat de spécialiste ou équivalent. Ils doivent être utilisés conjointement avec d'autres données cliniques et de laboratoire.

Ce test n'est pas indiqué pour le dépistage des nouveau-nés, les tests de diagnostic fœtal, les tests préimplantatoires ou à des fins de diagnostic autonome.

Le test est destiné à être utilisé sur l'instrument MiSeqDx d'Illumina.

Utilisation prévue du test de séquençage clinique de la fibrose kystique TruSight

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

Le test est destiné à être utilisé pour faciliter le diagnostic des personnes soupçonnées d'avoir la fibrose kystique (FK). Ce test est plus approprié lorsque le patient présente une fibrose kystique atypique ou non classique ou lorsque d'autres panels de mutation n'ont pas permis d'identifier les deux mutations étiologiques.

Les résultats de ce test doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinicien diplômé ou équivalent et doivent être utilisés avec les autres renseignements cliniques et de laboratoire disponibles, y compris les symptômes cliniques, d'autres tests de diagnostic et les antécédents familiaux.

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

Contexte de la fibrose kystique

Description clinique

La fibrose kystique (FK) est l'un des troubles génétiques les plus courants du monde occidental et le trouble autosomique récessif mortel le plus répandu au sein de la population blanche non hispanique³⁻⁷. La FK influe sur la viscosité des sécrétions de mucus et affecte l'épithélium des voies respiratoires, le pancréas, l'intestin, le système hépatobiliaire, l'appareil génital masculin et les glandes sudoripares, entraînant une maladie complexe touchant différents organes⁴⁻⁶; les poumons sont le premier système organique associé à la morbidité et à la mortalité⁸. Dans de nombreux cas, un trouble nutritionnel laisse présager une progression de l'atteinte des poumons liée à la FK. Un point clé des efforts d'intervention actuels est le diagnostic précoce par le biais d'un dépistage néonatal⁷. L'individu a ainsi accès aux soins dès son plus jeune âge et l'évolution de la maladie peut être mieux contrôlée^{4,7}. Même si le sexe influe sur les chances de survie (l'espérance de vie médiane étant plus élevée chez les hommes que chez les femmes), l'espérance de vie médiane globale est de 38,3 années aux États-Unis⁸.

Variants CFTR et incidence

Le gène régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), identifié en 1989, est situé sur le bras long du chromosome 7 et contient 27 exons codants répartis sur 230 kb⁴. Un ARNm de 6,5 kb produit par un allèle normal code le CFTR, une protéine intrinsèque de l'acide aminé 1 490 qui fonctionne comme un canal chlorure régulé dans les cellules épithéliales de nombreux organes^{4,5}. Plus de 1 900 variants du CFTR sont actuellement décrits, la majorité étant des mutations ponctuelles⁹. Le variant CFTR le plus courant est l'allèle F508del⁵, qui représente presque 70 % de tous les variants CFTR³. Cependant, d'autres variants CFTR courants se traduisent souvent par un phénotype de fibrose kystique ou des troubles liés au CFTR³⁻⁵.

Les estimations de l'incidence et de la prévalence de la maladie sont respectivement d'une naissance vivante sur 2 000 à 4 000 et d'environ 30 000 individus aux États-Unis⁴. Toutes les ethnies sont touchées, à des fréquences variables : un Caucasiens sur 3 000; un Hispano-américain sur 9 200; un Amérindien sur 10 900; un Afro-Américain sur 15 000 et un Asio-Américain sur 31 000^{4,6}. Les estimations actuelles de la fréquence d'un porteur de mutation du gène CFTR par groupe ethnique aux États-Unis, basées sur une cohorte de 364 890 individus faisant l'objet d'un test de dépistage et sans antécédents familiaux de fibrose kystique sont fournies dans [Tableau 1](#).

Tableau 1 Fréquence générale des porteurs de mutation du gène de la fibrose kystique selon les différents groupes ethniques aux États-Unis¹⁰

Groupe ethnique	Fréquence des porteurs observée
Afro-Américains	1 sur 84
Juifs ashkénazes	1 sur 29
Asiatiques	1 sur 242
Caucasiens	1 sur 28
Hispaniques	1 sur 59
Juifs	1 sur 32
Moyen-Orientaux	1 sur 91
Amérindiens	1 sur 70
Sud-Asiatiques	1 sur 118
Autre groupe ethnique	1 sur 111
Autre groupe ethnique : > groupe ethnique 1	1 sur 34
Autre groupe ethnique : en partie afro-américain	1 sur 56
Autre groupe ethnique : en partie caucasien	1 sur 32
Autre groupe ethnique : en partie hispanique	1 sur 51
Non indiqué	1 sur 37
Tous les individus	1 sur 38

Résumé et explication du test de 139 variants de la fibrose kystique

Aperçu du projet CFTR2

Le projet CFTR2 est une initiative internationale menée par une équipe de chercheurs et de cliniciens, qui est soutenue par une subvention de la National Institute of Health et de la U.S. Cystic Fibrosis Foundation^{11,12}. Le projet CFTR2 vise à fournir des renseignements cliniques et fonctionnels, à la fois complets et révisés par des experts, sur les variants CFTR. Dans le but de valider cliniquement tous les variants de la fibrose kystique avec des fréquences d'allèle de 0,01 % et plus, 25 registres et cliniques traitant la fibrose kystique dans le monde¹³ ont rassemblé des ressources afin de faire le rapprochement entre des renseignements cliniques provenant de plus de 39 000 patients atteints de la fibrose kystique, avec près de 1 900 variants de la fibrose kystique qui ont été enregistrés au fil des années dans la base de données CFTR1 de l'Hôpital pour enfants malades de Toronto^{11,13}. Des caractéristiques cliniques, comme la concentration de chlorure dans la sueur, les fonctions pulmonaires (FEV 1 % prévu) et l'état du pancréas ont été analysées avec les renseignements sur le génotype CFTR. L'approche systématique consistant à analyser simultanément ces variants des points de vue clinique, fonctionnel et génétique a permis de générer 134 variants uniques provoquant la fibrose kystique au niveau de 129 positions génomiques uniques (étant donné que pour cinq positions, deux modifications de nucléotide apparaissent à la même position) contenus dans la base de données CFTR2 (depuis août 2013). L'utilisation d'un panel comprenant tous ces variants devrait représenter 95,4 % des allèles provoquant la fibrose kystique et faire augmenter de 72 % à environ 91 % le taux d'identification des couples présentant un risque par le biais d'une détection des deux allèles, et en utilisant le panel de 23 variants recommandé par l'ACMG.

Variants CFTR du panel

Les variants rapportés par le test de 139 variants de la fibrose kystique ont été spécifiquement choisis, car ils représentent l'ensemble complet de variants validés sur le plan clinique qui sont classés comme provoquant la fibrose kystique dans la base de données CFTR2 à l'université Johns Hopkins, un produit de l'initiative CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR).

Le test est prévu pour : 134 variants provoquant la fibrose kystique; un variant de panel recommandé par l'ACMG (R117H, classé comme une mutation aux conséquences cliniques variables ou MVCC, selon CFTR2); un variant de modification rapporté sous certaines conditions (PolyTG/PolyT); et trois variants bénins rapportés sous certaines conditions (I506V, I507V, F508C)¹⁴; pour un total de 139 variants rapportés.

Les 134 variants provoquant la fibrose kystique correspondent aux 129 variants provoquant la fibrose kystique dans la base de données CFTR2. La base de données CFTR2 comprend cinq variants provoquant la fibrose kystique pour lesquels la même modification de niveau de protéine peut provenir de deux modifications de nucléotide distinctes [p. ex., S466X(C>A) et S466X(C>G)]. Ces cinq variants sont répertoriés en fonction du codon d'acide aminé dans la base de données CFTR2 (p. ex., S466X) tandis que le test rapporte chaque variant individuel (p. ex., S466X[C>A] et S466X[C>G]). La liste des 139 variants rapportés par le test de 139 variants de la fibrose kystique est fournie dans le [Tableau 2](#). Gras = ACMG-23; Italique = signalé sous certaines conditions]

Tableau 2 Résumé des variants du test de 139 variants de la fibrose kystique

[Les variants sont répertoriés par ordre de coordonnées génomiques; la modification de niveau de nucléotides associée pour chaque variant est exprimée entre parenthèses.]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	R553X (c.1657C>T)	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	R560T (c.1679G>C)	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	R347P (c.1040G>C)	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
G85E (c.254G>A)	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	1898+1G>A (c.1766+1G>A)	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X(c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X(c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	2184delA (c.2052delA)	R1162X (c.3484C>T)
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	3659delC (c.3528delC)
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	A455E (c.1364C>A)	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
R117H (c.350G>A)	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)

Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	3849+10kbC>T (c.3717+12191C>T)
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) [†]	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
621+1G>T (c.489+1G>T)	S489X (c.1466C>A)	2585delT (c.2453delT)	3876delA (c.3744delA)
663delT (c.531delT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)
G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)
711+1G>T (c.579+1G>T)	I507del (c.1519_1521delATC)	E831X (c.2491G>T)	W1282X (c.3846G>A)
711+3A>G (c.579+3A>G)	F508del (c.1521_1523delCTT)	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)
712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	N1303K (c.3909C>G)
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) [†]	2789+5G>A (c.2657+5G>A)	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	1717-1G>A (c.1585-1G>A)	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	G542X (c.1624G>T)	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R (c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>PolyTG/PolyT</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A>G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A>G)</i>
R334W (c.1000C>T)	G551D (c.1652G>A)	3120+1G>A (c.2988+1G>A)	<i>F508C (c.1523T>G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

[†] Répertoire dans la base de données CFTR2¹² comme variant provoquant la fibrose kystique, tandis que l'article de Sosnay¹³ répertorie le variant comme indéterminé. La classification de la base de données est plus récente et tient compte du test fonctionnel réalisé qui n'était pas disponible au moment de la publication de l'article de Sosnay.

Résumé et explication du test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Conception du test

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



REMARQUE :

Il existe des limites à la détection de délétions au niveau des emplacements génomiques spécifiques au sein des régions séquencées de ce test (voir la section *Limites du test de séquençage clinique de la fibrose kystique*, page 9).

Tableau 3 Couverture des coordonnées génomiques du test de séquençage clinique de la fibrose kystique

	Début des coordonnées génomiques hg19 (chr7)	Fin des coordonnées génomiques hg19 (chr7)	Longueur (paire de bases)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7^	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10^	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12*	117229516	117229526	11
CFTR_Exon13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon20#	117251605	117251872	268
CFTR_Exon21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22*	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Nombre total de bases			5 203**

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

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

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

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

Principes procéduraux

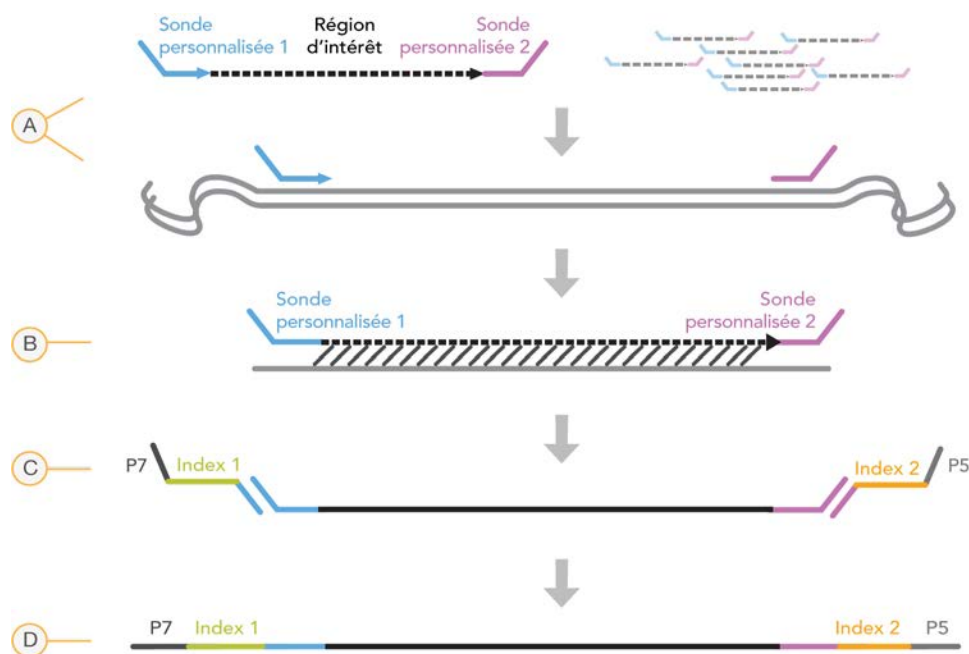
La préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight sert à la préparation manuelle des librairies aux fins du séquençage de l'ADN d'échantillons de sang entier périphérique. La préparation de la librairie comporte quatre étapes clés : l'hybridation, l'extension-ligation, l'amplification PCR et la normalisation des librairies.



REMARQUE

La préparation de la librairie pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique est identique.

Préparation de librairies



- A Hybridation :** la première étape, l'hybridation, hybride un groupe d'oligonucléotides en amont et en aval spécifiques au gène de la fibrose kystique en échantillon d'ADN génomique. À la fin de ce processus, une procédure de lavage en trois étapes avec un filtre capable de sélectionner la taille retire les oligonucléotides non liés de l'ADN génomique.
- B Extension-ligation :** la deuxième étape, l'extension-ligation, connecte les oligonucléotides en amont et en aval hybridés. Un ADN polymérase s'étend des oligonucléotides en amont dans la région ciblée, suivi par une ligation à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide en aval à l'aide d'un ADN ligase. Le résultat est la formation de produits contenant des oligonucléotides spécifiques à la FK bordés de séquences nécessaires pour l'amplification.
- C Amplification PCR :** la troisième étape, l'amplification PCR, amplifie les produits d'extension-ligation à l'aide d'adaptateurs d'index qui ajoutent les séquences d'indexage pour le multiplexage des échantillons, tout comme les adaptateurs courants nécessaires à la génération d'amplifiats sur l'instrument MiSeqDx. À la fin de ce processus, une procédure de nettoyage de PCR purifie les produits PCR (désignés comme une librairie).

- D Normalisation de librairie :** la dernière étape, la normalisation de librairie, normalise la quantité de chaque librairie pour assurer une représentation plus égale dans la dernière librairie regroupée. À la fin du procédé, la librairie regroupée est chargée sur l'instrument MiSeqDx pour le séquençage au moyen de la chimie de séquençage par synthèse.

Séquençage

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

Analyse des données

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

- ▶ **Démultiplexage :** si l'analyse contient plusieurs échantillons et que l'analyse présente des lectures d'index, alors le démultiplexage est la première étape dans l'analyse secondaire. Le démultiplexage sépare les données d'échantillons regroupés basées sur les index de séquence unique qui ont été ajoutés au cours de l'étape d'amplification par PCR.
- ▶ **Génération de fichiers FASTQ :** après le démultiplexage, Local Run Manager génère des fichiers intermédiaires au format FASTQ, qui est un format texte utilisé pour représenter des séquences. Les fichiers FASTQ contiennent les lectures de chaque échantillon ainsi que les scores de qualité, à l'exclusion des lectures provenant de tout amplifiat n'ayant pas passé le filtre.
- ▶ **Alignement :** l'alignement compare les séquences par rapport à la référence pour déceler une relation entre les séquences et attribue un score en fonction des régions de similarité. Les lectures alignées sont écrites dans des fichiers au format BAM. Pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique, l'algorithme de Smith-Waterman par bande effectue l'alignement local des séquences pour identifier les régions similaires entre deux séquences.
- ▶ **Appel des variants :** cette étape enregistre des variants mononucléotides (SNV), des insertions et des délétions (indels), et autres variants structuraux dans un fichier texte standardisé appelé TruSightCF139VariantAssay.txt pour le test de 139 variants de la fibrose kystique ou TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique.

Pour obtenir plus de renseignements sur le flux de travail de l'analyse, consultez les guides du logiciel d'analyse installé sur votre MiSeqDx. Pour le *Guide du flux de travail du module d'analyse 2.0 du test de 139 variants de la fibrose kystique dans Local Run Manager*, consulter (document n° 1000000100945) Pour le *Guide du flux de travail du module d'analyse 2.0 de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager*, consulter le (document n° 1000000100946).

Limites du test de 139 variants de la fibrose kystique

- ▶ Destiné au diagnostic *in vitro*.
- ▶ Les résultats obtenus à l'aide du test de 139 variants de la fibrose kystique doivent être utilisés et interprétés dans le contexte d'une évaluation clinique complète.
- ▶ Le test est conçu pour identifier un sous-ensemble spécifique de variants connus dans le gène CFTR, mais n'inclut pas tous les variants identifiés dans le gène CFTR. Plus précisément, le test ne signale que les modifications au niveau des acides aminés si ces derniers sont associés aux changements de nucléotide répertoriés dans le [Tableau 2](#). Alors que d'autres modifications au niveau des nucléotides peuvent conduire aux mêmes variations au niveau des acides aminés, celles-ci ne seront pas signalées par le test. Par conséquent, si un variant n'est pas identifié, cela ne garantit pas que d'autres variants CFTR ne sont pas présents dans les échantillons analysés.
- ▶ Les variants identifiés par le biais de ce test varient en fréquence parmi les différentes populations.
- ▶ Comme avec n'importe quel test d'hybridation, les polymorphismes ou variants sous-jacents dans les régions de liaison d'un oligonucléotide peuvent affecter les allèles sondés et, par conséquent, les appels faits.
- ▶ Le test ne permet pas de déterminer si l'orientation du variant PolyTG/PolyT est en cis/trans sur le variant R117H. Pour les patients présentant un variant R117H, des tests supplémentaires doivent être effectués pour déterminer si un variant PolyTG/PolyT, qui peut affecter le phénotype clinique (p. ex., 12-13(TG) ou 5T), présente une orientation cis/trans sur le variant R117H.
- ▶ PolyTG/PolyT sont des régions homopolymériques connues pour être difficiles à interpréter avec des tests basés sur le séquençage en raison du glissement de polymérase. Un taux de 0,9 % (4/448) d'appels incorrects a été observé pour des résultats PolyTG/PolyT démontrant un écart de ± 1 TG par rapport au séquençage bidirectionnel Sanger dans le [Tableau 16](#).

Limites du test de séquençage clinique de la fibrose kystique

- ▶ Destiné au diagnostic *in vitro*.
- ▶ Les résultats du test de séquençage clinique de la fibrose kystique doivent être utilisés et interprétés dans le contexte d'une évaluation clinique complète.
- ▶ Le test séquence les régions suivantes dans le gène CFTR :
 - ▶ Les régions de codage de protéine du gène CFTR dans 27 exons.
 - ▶ Entre 5 et 10 bases de séquence intronique adjacente.
 - ▶ 100 nucléotides de séquence intronique des régions non traduites 5' et 3'.
 - ▶ Deux mutations profondes introniques (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T).
 - ▶ La séquence PolyTG/PolyT située dans l'intron 9.
 - ▶ Un total de 5 206 positions et régions des possibles 188 702 paires de bases du gène.
- ▶ Le test est conçu pour séquencer les régions de codage de protéine et les limites intron et exon du gène CFTR et n'inclut pas toutes les régions introniques et les grandes délétions. Ainsi, un résultat global de type sauvage ne garantit pas que les autres mutations ou variants du régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) ne sont pas présents dans les échantillons analysés.
 - ▶ Le test est conçu pour détecter deux grandes délétions précises, soit les CFTRdele2,3 et CFTRdele22,23. Le test ne peut pas détecter d'autres grandes délétions ni générer de rapports à ce sujet. Ce test est uniquement validé pour les insertions et délétions, jusqu'à et y compris une taille de 3 pb.
- ▶ Toutes les insertions et délétions sont alignées à gauche dans les régions homopolymériques ou alignées à droite suivant la nomenclature HGVS. Par exemple, le variant c.313delA (avec le contexte de séquence GAATC) est identifié comme une délétion G-ATC, mais la délétion est signalée dans dbSNP en tant que délétion GA-TC. Les seules exceptions sont les 135 variants de la fibrose kystique répertoriés dans le CFTR2 comme

responsables de la maladie (d'après la version de la base de données en date du 04/10/2012). Tous les indels dans les régions homopolymériques au sein de cette série de variants sont rapportés comme correspondant au rapport de variants attendu selon le CFTR2¹³.

- Le test est limité dans la détection des délétions à des emplacements génomiques spécifiques au sein des régions séquencées. Les coordonnées génomiques dont le test ne peut pas rapporter les délétions sont répertoriées dans le **Tableau 4**. Le test ne peut pas détecter les délétions dont la ou les bases se situent dans la colonne des limites.

Tableau 4 Coordonnées génomiques où les délétions ne peuvent pas être détectées

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

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

- Si les coordonnées concernées répertoriées dans le **Tableau 4** sont la base située la plus à gauche d'une région homopolymérique, une délétion à n'importe quelle autre position au sein du tronçon homopolymérique ne pourra pas être détectée, parce qu'elle ne pourra pas se distinguer d'une délétion au niveau des coordonnées concernées.
- Le test ne peut pas détecter un total de cinq variants répertoriés dans la base de données clinique ClinVar (version de la base de données consultée en décembre 2014). Ces cinq variants précis sont compris dans le **Tableau 5**. La limite de ce test n'a aucune incidence sur les variants répertoriés dans la base de données sur la fibrose kystique, CFTR2 (version de la base de données en date du 04/10/2012). Aucune donnée de fréquence n'était disponible pour les variants.

Tableau 5 Variants connus non détectés par le test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Référence du variant	Identifiant ClinVar	Région du gène CFTR	Emplacement génomique (chr 7)	cDNA Name (HGVS) (Nom d'ADNc)	Nom de protéine (HGVS)	Identifiant rs
1	RCV000046424	CFTR_ Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_ Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_ Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_ Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_ Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

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

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

Tableau 6 Variant complexe, exemple

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

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



REMARQUE

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

Ce test ne peut pas déterminer s'il existe des variants en cis ou trans par rapport à d'autres variants.

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

Composants du produit

La trousse TruSight sur la fibrose kystique se compose des éléments suivants :

- La Préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight (n° de référence 20036925)

Réactifs fournis

Les réactifs pour la préparation des librairies TruSight sur la fibrose kystique sont fournis par Illumina. Cette trousse a été configurée pour 1 à 4 utilisations avec un maximum de 96 échantillons par trousse.

Préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight, Boîte 1

Les réactifs de la Boîte 1 sont expédiés congelés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre -25 °C et -15 °C. Les réactifs sont stables pendant un maximum de six cycles gel-dégel qui doivent se produire avant la date de péremption indiquée.

Tableau 7 Boîte 1A : réactifs de préamplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Pool d'oligos de la fibrose kystique	1 tube	600 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides ciblant le gène <i>CFTR</i>	de -25 à -15 °C
Tampon d'hybridation	1 tube	4,32 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et du formamide.	de -25 à -15 °C
Mélange extension-ligation	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un mélange exclusif d'ADN polymérases, de ligase ADN et des dNTP.	de -25 à -15 °C
Primers d'index 2 (A501–A508)	1 tube par primer	192 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage.	de -25 à -15 °C
Primers d'index 1 (A701–A712)	1 tube par primer	128 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage.	de -25 à -15 °C
Polymérase PCR	1 tube	56 µl	ADN polymérase exclusive.	de -25 à -15 °C
Mélange maître PCR	1 tube	2,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des dNTP.	de -25 à -15 °C

Tableau 8 Boîte 1B : réactifs de postamplification

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

Préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight, Boîte 2

Les réactifs de la Boîte 2 sont expédiés réfrigérés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Tableau 9 Boîte 2 : réactifs de préamplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Plaque filtrante	4 plaques	S. O.	Plaque de microtitration en polypropylène avec une membrane en polyéthersulfone modifiée.	de 15 à 30 °C

Tableau 10 Boîte 2 : réactifs de postamplification

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

Préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight, Boîte 3

Les réactifs de la Boîte 3 sont expédiés réfrigérés et sont stables lorsqu'ils sont stockés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Tableau 11 Boîte 3A : réactifs de préamplification

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

Tableau 12 Boîte 3B : réactifs de postamplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage (ml)	Ingrédients actifs	Stockage
Billes de nettoyage PCR	1 tube	5	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide et du polyéthylène glycol.	de 2 à 8 °C
Lavage de normalisation de librairie	2 tubes	4,8	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide.	de 2 à 8 °C
Billes de librairie	1 tube	1,2	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide.	de 2 à 8 °C

Réactifs nécessaires, non fournis

Réactifs de préamplification

- NaOH de 10 N (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)

- ▶ Tampon TE
- ▶ Eau sans DNase ni RNase

Réactifs de postamplification

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

Réactifs MiSeqDx

- ▶ Trousse de réactifs MiSeqDx v3 (n° de référence 20012552 ou 20037124, selon la région)
- ▶ Hypochlorite de sodium 5 %
- ▶ Tween 20
- ▶ Eau de laboratoire

Stockage et manipulation

- 1 La température ambiante correspond à une température de 15 °C à 30 °C.
- 2 Le tampon d'hybridation, le tampon de lavage rigoureux et les réactifs du diluant de normalisation de librairie peuvent former des précipités ou des cristaux visibles. Avant l'utilisation, agitez vigoureusement, puis inspectez visuellement pour vous assurer qu'il n'y a aucun précipité.
- 3 Respectez les pratiques exemplaires suivantes lorsque vous manipulez les billes de nettoyage PCR et les billes de librairie.
 - ▶ Les billes ne doivent jamais être congelées.
 - ▶ Laissez les billes atteindre la température ambiante.
 - ▶ Immédiatement avant l'utilisation, mélangez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex jusqu'à obtenir une suspension adéquate et que la couleur apparaisse homogène.
 - ▶ Mélangez bien l'échantillon après que les billes ont été ajoutées en pipettant de haut en bas 10 fois. Un agitateur peut être utilisé pour bien mélanger les échantillons.
 - ▶ Incubez le mélange bille et échantillon à température ambiante pendant la durée totale indiquée.
 - ▶ Suivez les instructions lorsque vous utilisez un support magnétique. Attendez que la solution soit claire avant d'aspirer. Gardez la plaque sur le support magnétique lorsque vous aspirez doucement le surnageant, en prenant soin de ne pas déranger les billes séparées.
- 4 Ne congelez pas les billes de librairie ou ne les mélangez pas avec le réactif du diluant de normalisation de librairie si ce n'est pas pour une utilisation immédiate.

Équipement et matériel

Équipement et matériel fournis, vendus séparément

- ▶ Instrument MiSeqDx, n° de référence DX-410-1001
- ▶ Trousse de montage de plaque d'index TruSeq, no de référence FC-130-1005
- ▶ Trousse de montage de plaque d'index TruSeq et de collier, no de référence FC-130-1007
- ▶ Bouchons de remplacement pour l'adaptateur d'index, no de référence DX-502-1003
- ▶ Tube MiSeq, n° de référence MS-102-9999

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Équipement et matériels de préamplification

- ▶ **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Vous pouvez utiliser des blocs chauffants avec couvercles chauffés. L'utilisation des thermocycleurs à refroidissement actif ou de blocs chauffants (p. ex, le refroidissement thermoélectrique, Peltier) n'est pas recommandée pour l'étape d'hybridation. L'étape de refroidissement passif est essentielle pour une hybridation adéquate. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - ▶ Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
 - ▶ Régulation de température : $\pm 0,1$ °C à 37 °C; $\pm 0,4$ °C à 60 °C
- ▶ **Incubateur d'échantillons** : un incubateur (four à hybridation) est nécessaire. L'incubateur doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - ▶ Plage de températures : 10 °C à 100 °C
 - ▶ Régulation de température : $\pm 0,2$ °C
- ▶ **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table à température réglable pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. Une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de préamplification. Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaque à 96 puits avec filtre atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 × g).
- ▶ **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. Un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de préamplification. L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer d'une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes monocanal ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
- ▶ **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires :
 - ▶ Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
 - ▶ Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
 - ▶ Bassin de solution, sans PVC ni ADNase/ARNase (cuve)
 - ▶ Opercule adhésif en aluminium
 - ▶ Joint de plaque PCR approprié
 - ▶ Pointes de pipette résistantes à l'aérosol
 - ▶ Tubes coniques, 15 ml

Équipement et matériels de postamplification

- ▶ **Thermocycleur** : un thermocycleur est nécessaire. Le thermocycleur doit avoir un couvercle chauffé et respecter les spécifications de performance suivantes :
 - ▶ Plage de régulation de la température : de 4 °C à 99 °C
 - ▶ Précision du contrôle : $\pm 0,25$ °C de 35 °C à 99 °C
- ▶ **Agitateur pour microplaques** : un agitateur pour microplaques est nécessaire dans la zone de postamplification du laboratoire. L'agitateur pour microplaques doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - ▶ Vitesse de mélange maximale : 3000 tr/min
 - ▶ Plage de vitesses de mélange : 200 à 3000 tr/min
- ▶ **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. Une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de préamplification. Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 × g).
- ▶ **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour les tubes est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - ▶ Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C
 - ▶ Régulation de température : $\pm 0,1$ °C à 37 °C; $\pm 0,4$ °C à 60 °C

- ▶ **Support magnétique** : un support magnétique pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Les meilleures performances sont atteintes lorsque les aimants sont du côté du support et non au fond.
- ▶ **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. Un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de préamplification. L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer d'une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes monocanal ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
- ▶ **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C et qui accepte les tubes de microcentrifugeuse est nécessaire. Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 1 000 × g).
- ▶ **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires :
 - ▶ Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
 - ▶ Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)



REMARQUE

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

- ▶ Tubes coniques, 15 ml et 50 ml
- ▶ Tubes de microcentrifugeuse (bouchon vissé recommandé)
- ▶ Barrettes de huit tubes PCR
- ▶ Bassins de solution, sans PVC ni ADNase/ARNase (cuve)
- ▶ Opercules adhésifs en aluminium
- ▶ Adhésif de plaque à usage unique
- ▶ Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Prélèvement, transport et stockage des échantillons



REMARQUE

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

- ▶ Les échantillons de sang entier recueillis dans les tubes K₂EDTA peuvent être utilisés.
- ▶ Les échantillons de sang total peuvent être stockés pendant un maximum de sept jours à température ambiante, jusqu'à 30 jours entre 2 °C et 8 °C, ou jusqu'à 30 jours entre -25 °C et -15 °C.
- ▶ Transportez les échantillons de sang total pendant un maximum de sept jours à température ambiante, 30 jours entre 2 °C et 8 °C, ou 30 jours entre -25 °C et -15 °C. Le transport du sang entier doit être conforme réglementations nationales, fédérales, étatiques et locales applicables sur le transport d'agents étiologiques.
- ▶ Aucun effet négatif sur les performances du test n'a été observé lorsque l'ADN génomique a été soumis à six cycles de congélation/décongélation.
- ▶ Aucun effet négatif sur les performances du test n'a été observé sur les échantillons de sang total contenant un taux élevé de bilirubine, de cholestérol, de triglycéride, d'ETDA ou d'hémoglobine.

Avertissements et précautions



ATTENTION

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

**AVERTISSEMENT**

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html. (Consultez la section *Réactifs fournis*, page 12 pour obtenir de plus amples renseignements.)

- ▶ Certains composants de ce test contiennent du 2-mercaptoéthanol, un agent réducteur. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée et mettez au rebut les conteneurs et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html. (Consultez la section *Réactifs fournis*, page 12 pour obtenir de plus amples renseignements.)
- ▶ Certains composants de ce test contiennent du formamide, un amide aliphatique constituant probablement une toxine reproductive. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux normes gouvernementales de sécurité en vigueur dans votre région. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html. (Consultez la section *Réactifs fournis*, page 12 pour obtenir de plus amples renseignements.)
- ▶ Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.
- ▶ Le non-respect des procédures décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
- ▶ Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs du test. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs du test.
- ▶ N'utilisez aucun composant du test au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du carton du test. N'interchangez pas les composants du test venant de lots de test différents. Les lots de test sont indiqués sur l'étiquette du carton du test.
- ▶ Pour empêcher la dégradation des échantillons ou des réactifs, veillez à ce que toutes les vapeurs d'hypochlorite de sodium se dissipent avant de commencer le protocole.
- ▶ Les pratiques de laboratoire appropriées et une bonne hygiène dans le laboratoire sont nécessaires pour empêcher les produits PCR de contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique. La contamination par des produits PCR peut causer des résultats erronés et non fiables.
- ▶ Les changements dans l'apparence physique des réactifs fournis peuvent indiquer la détérioration des matières. Si des changements dans l'apparence physique se produisent (p. ex., des changements apparents de la couleur des réactifs ou une trace de voile montrant une contamination microbienne), n'utilisez pas les réactifs.
- ▶ Pour éviter la contamination, séparez physiquement les zones de préamplification et de postamplification aient des équipements réservés (p. ex., pipettes, pointes de pipette, agitateur et centrifugeuse).
- ▶ Évitez la contamination croisée. Utilisez des nouvelles pointes de pipette entre les échantillons et entre les réactifs distribués. Mélangez les échantillons à l'aide d'une pipette et centrifugez la plaque lorsque cela est indiqué. N'agitez pas les plaques. L'utilisation des pointes résistantes à l'aérosol réduit le risque de rétention d'amplicons et de contamination croisée d'un échantillon à l'autre.

- ▶ L'appairage index-échantillon doit correspondre aux renseignements sur l'échantillon saisies pour l'analyse MiSeqDx. Les inadéquations entre les renseignements sur l'échantillon et le schéma de la plaque entraîneront une perte de l'identification positive des échantillons et un rapport de résultats erroné.
- ▶ Préparez toujours une nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau présente dans l'air, ce qui affecte les résultats.
- ▶ Respectez le temps de séchage indiqué après l'étape du support magnétique pour vous assurer que l'éthanol s'évapore complètement. L'éthanol résiduel peut modifier les performances des réactions ultérieures.
- ▶ Conservez les composants du test à la température spécifiée dans les zones de préamplification et de postamplification indiquées.
- ▶ Des cycles de congélation/décongélation répétés (jusqu'à six) des composants de la boîte 1 ne compromettent pas l'intégrité du test.
- ▶ Ne mélangez pas le pool d'oligos de fibrose kystique et le tampon d'hybridation avant stockage. Une fois mélangé, le pool d'oligos de fibrose kystique devient instable, même s'il est stocké congelé.
- ▶ L'utilisation des thermocycleurs à refroidissement actif (p. ex., le refroidissement thermoélectrique, Peltier) n'est pas recommandée pour l'étape de l'hybridation. L'étape de refroidissement passif est essentielle pour une hybridation adéquate.
- ▶ Ajoutez toujours la polymérase PCR au mélange maître PCR juste avant l'utilisation. Ne stockez jamais le mélange maître une fois combiné.
- ▶ Durant l'étape de normalisation de la librairie, il est extrêmement important de remettre en suspension complètement le culot des billes de la librairie. Cette étape est essentielle pour obtenir une densité uniforme des amplifiats sur la Flow Cell de l'instrument MiSeqDx.
- ▶ Respectez les temps d'incubation indiqués dans l'étape de normalisation de la librairie. Une incubation inappropriée peut affecter la représentation de la librairie et la densité des amplifiats.
- ▶ En raison du nombre de transferts de plaque et du risque subséquent de contamination, faites preuve d'extrême prudence pour vous assurer que le contenu du puits reste entièrement dans le puits. Ne faites pas éclabousser le contenu.
- ▶ La recommandation en matière d'entrée d'ADN de 250 ng permet la variation de quantité d'ADN. La performance de la trousse dépend de ce niveau d'entrée.
- ▶ Les variants d'échantillon portant la désignation « No Call » (Aucun-appel) sur le rapport des tests indiquent que les données correspondant à cette position de variant ne respectent pas les seuils de séquençage définis. Ne rapportez pas les variants portant la désignation « No Call » (Aucun-appel), sauf si les tests répétés produisent des valeurs respectant les seuils définis et ne sont plus désignés comme « No Call » (Aucun-appel).

Sigles

Tableau 13 Sigles de la préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight

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

Ressources supplémentaires

Les pages d'assistance TruSight sur la fibrose kystique du site Web Illumina fournissent des logiciels, des ressources de formation, des renseignements sur la compatibilité des produits et la documentation suivante. Consultez régulièrement les pages d'assistance pour voir la plus récente version de ces documents.

Ressource	Description
<i>Guide du flux de travail du module d'analyse 2.0 du test de 139 variants de la fibrose kystique dans Local Run Manager (document n° 1000000100945)</i>	Fournit des instructions sur la configuration des paramètres d'analyse pour le séquençage et l'analyse du module d'analyse 2.0 des 139 variants de la fibrose kystique.
<i>Guide du flux de travail du module d'analyse 2.0 de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager (document n° 1000000100946)</i>	Fournit des instructions sur la configuration des paramètres d'analyse pour le séquençage clinique du module d'analyse 2.0 de la fibrose kystique.
<i>Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)</i>	Fournit des instructions sur la création d'une analyse, le suivi de l'état, l'analyse des données de séquençage et la visualisation des résultats sur l'instrument MiSeqDx.
<i>Guide de référence de l'instrument MiSeqDx avec MOS v2 (document n° 1000000021961)</i>	Fournit des instructions sur la mise en place et le séquençage des analyses, y compris les procédures d'entretien de l'instrument MiSeqDx.

Notes procédurales

- ▶ Illumina exige qu'un échantillon d'ADN à contrôle positif et un échantillon à contrôle négatif (NTC ou contrôle sans modèle) soient inclus dans chaque analyse qui est définie comme une série d'échantillons traités en parallèle. L'échantillon d'ADN de contrôle positif doit être un échantillon correctement caractérisé présentant un ou plusieurs variants CFTR connus. Illumina recommande l'utilisation d'un contrôle de type sauvage. Le contrôle de type sauvage doit être exécuté comme un échantillon et ne doit pas remplacer le contrôle positif ou négatif.
- ▶ Avant de commencer le test des 139 variants de la fibrose kystique ou le test de séquençage clinique de la fibrose kystique, il faut extraire l'ADN de sang entier et la quantifier.
- ▶ Toute méthode d'extraction d'ADN validée peut être utilisée.
- ▶ Quantifiez l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Vérifiez que le rapport A260/A280 de l'échantillon d'ADN est supérieur à 1,5. Normalisez l'échantillon d'ADN sur 50 ng/µl. Chaque échantillon nécessite 5 µl d'ADN génomique (250 ng au total).
- ▶ Conservez les composants du test à la température spécifiée dans les zones de préamplification et de postamplification indiquées.
- ▶ Des cycles de congélation/décongélation répétés (jusqu'à six) des composants de la boîte 1 ne compromettent pas l'intégrité du test.

Débit d'échantillons

Pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique, le débit d'échantillons par analyse MiSeqDx peut être de 24 à 96 échantillons. Les primers d'indexage utilisés pendant l'amplification par PCR doivent être choisis en fonction du débit d'échantillons final souhaité pour assurer que chaque librairie utilise une combinaison d'index unique.



REMARQUE

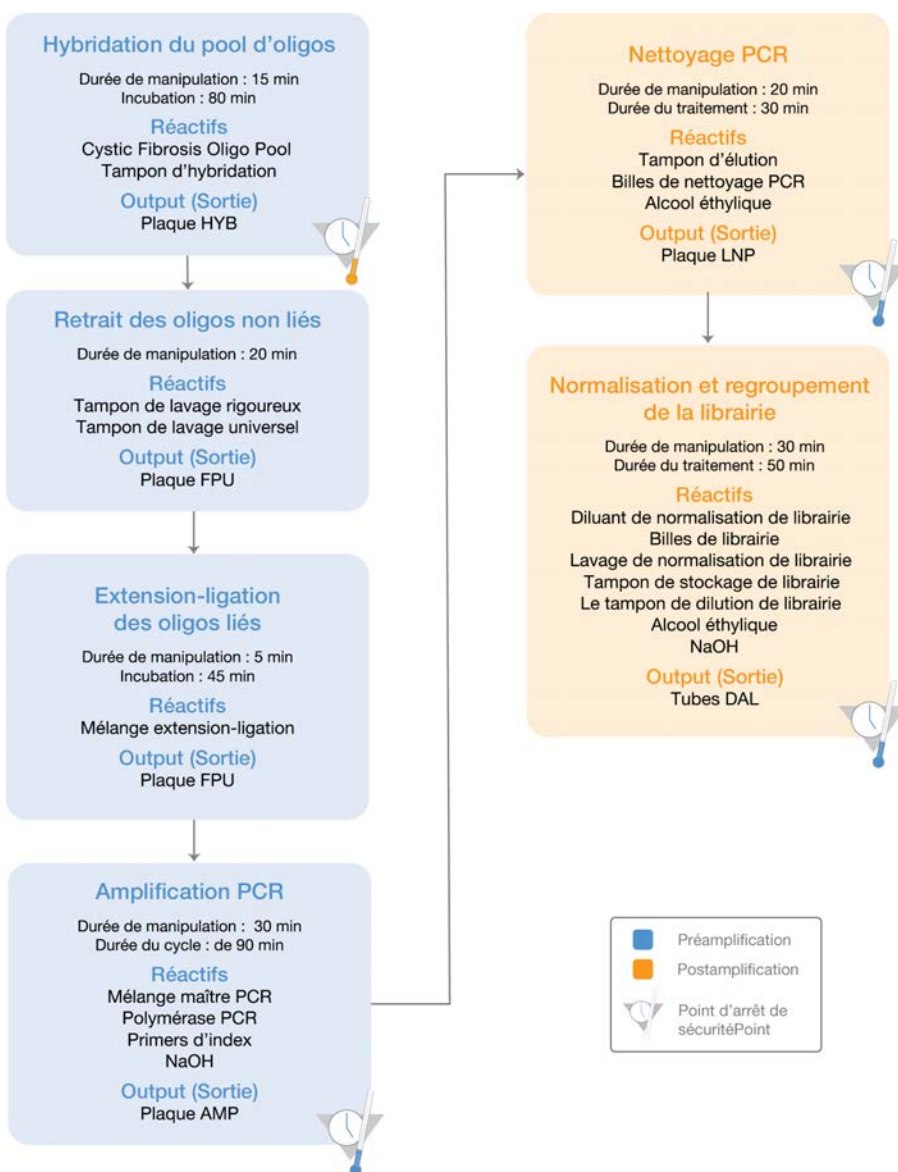
Continuer avec moins de 24 échantillons n'est pas validé par Illumina.

Flux de travail pour la préparation des librairies

Le diagramme suivant illustre le flux de préparation des librairies pour le test de fibrose kystique à 139 variants et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique. Les étapes de préamplification comprennent : l'hybridation du pool d'oligos, l'élimination des oligos non liés et l'extension-ligation des oligos liés. Pour l'étape d'amplification PCR, la configuration de la plaque PCR se fait dans la zone préamplification, tandis que la PCR sur le thermocycleur se fait dans la zone post-amplification. Les étapes de postamplification comprennent : le nettoyage de la PCR et la normalisation et le regroupement des librairies.

Les points d'arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes.

Figure 1 Flux de préparation des librairies pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique



Mode d'emploi

La Préparation de la librairie sur la fibrose kystique TruSight prend en charge deux tests, le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique. Le flux de travail de TruSight sur la fibrose kystique comprend la sélection des tests, la préparation de la librairie, le séquençage et le lavage après analyse. À l'exception de la sélection des tests, toutes les étapes de la procédure sont identiques pour les deux tests.

Sélection des tests et configuration de l'analyse

- ▶ Si vous utilisez le test de 139 variants de la fibrose kystique, consultez *Utilisation du module d'analyse 2.0 du test de 139 variants de la fibrose kystique dans Local Run Manager*, page 21
- ▶ Si vous utilisez le test de séquençage clinique de la fibrose kystique, consultez *Utilisation du module d'analyse 2.0 de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager*, page 22

Utilisation du module d'analyse 2.0 du test de 139 variants de la fibrose kystique dans Local Run Manager

Définir les paramètres

- 1 Connectez-vous à Local Run Manager.
- 2 Sélectionnez **Create Run** (Créer l'analyse), puis sélectionnez **CF 139Variant 2.0** (139 variants de fibrose kystique 2.0).
- 3 Entrez un nom qui désignera l'analyse, du séquençage jusqu'à la fin du processus.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des tirets de soulignement ou des tirets (40 caractères ou moins).
- 4 **[Facultatif]** Saisissez une description de l'analyse.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des tirets de soulignement ou des tirets (150 caractères ou moins).
- 5 Entrez le numéro de lot et la date de péremption de la trousse de préparation des librairies.

Sélection des échantillons à analyser

Précisez les échantillons à analyser en utilisant l'une des options suivantes :

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

Saisie manuelle des échantillons

- 1 Saisissez un nom d'échantillon unique dans le champ Sample Name (Nom de l'échantillon).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des tirets de soulignement (40 caractères ou moins).
- 2 Cliquez avec le bouton droit et sélectionnez les échantillons de contrôle positifs ou négatifs.
Afin d'enregistrer une analyse, elle doit avoir au moins un contrôle positif et un contrôle négatif.
- 3 **[Facultatif]** Entrez la description de l'échantillon à l'onglet Description.
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des tirets de soulignement (50 caractères ou moins).
- 4 **[Facultatif]** Sélectionnez un adaptateur d'index 1 dans la liste déroulante Index 1 (i7).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 se remplissent automatiquement avec une mise en page par défaut.
- 5 **[Facultatif]** Sélectionnez un adaptateur d'index 2 dans la liste déroulante Index 2 (i5).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 se remplissent automatiquement avec une mise en page par défaut.
- 6 Cliquez sur l'icône **Print** (Imprimer) pour afficher la présentation de la plaque.

- 7 Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer le schéma de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques.
- 8 **[Facultatif]** Sélectionnez **Export** (Exporter) pour exporter le fichier de renseignements sur l'échantillon.
- 9 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).
Si moins de 24 échantillons ont été saisis, la fenêtre Insufficient Sample (Échantillon insuffisant) s'affiche. Sélectionnez **Proceed** (Procéder) pour continuer, ou sélectionnez **Cancel** (Annuler) pour modifier les échantillons.



ATTENTION

Le séquençage avec des bibliothèques groupées qui contiennent moins de 24 échantillons n'est pas validé par Illumina.

Importation des échantillons

Les renseignements sur les échantillons peuvent être importés de deux types de fichiers :

- ▶ Un fichier de renseignements sur les échantillons qui a été exporté du module d'analyse 2.0 des 139 variants de la fibrose kystique en utilisant la fonction Export (Exporter).
- ▶ Un fichier de modèle, qui peut être généré en sélectionnant **Template** (Modèle) sur l'écran Create Run (Créer l'analyse). Le fichier de modèle contient les en-têtes de colonnes corrects pour l'importation, avec des renseignements fictifs dans chaque colonne. Utilisez un éditeur externe pour personnaliser le fichier de modèle :
 - 1 Ajoutez les renseignements sur chaque échantillon de l'analyse.
 - 2 Une fois que tous les renseignements sur les échantillon ont été ajoutés, supprimez tous les renseignements fictifs restants dans les cellules inutilisées.
 - 3 Enregistrez le fichier de modèle.

Pour importer les renseignements sur les échantillons :

- 1 Sélectionnez **Import Samples** (Importer les échantillons), puis cherchez le fichier et sélectionnez-le.
- 2 Cliquez sur l'icône **Print** (Imprimer) pour afficher la présentation de la plaque.
- 3 Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer le schéma de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques.
- 4 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).
Si moins de 24 échantillons ont été saisis, la fenêtre Insufficient Sample (Échantillon insuffisant) s'affiche. Sélectionnez **Proceed** (Procéder) pour continuer, ou sélectionnez **Cancel** (Annuler) pour modifier les échantillons.



ATTENTION

Le séquençage avec des bibliothèques groupées qui contiennent moins de 24 échantillons n'est pas validé par Illumina.

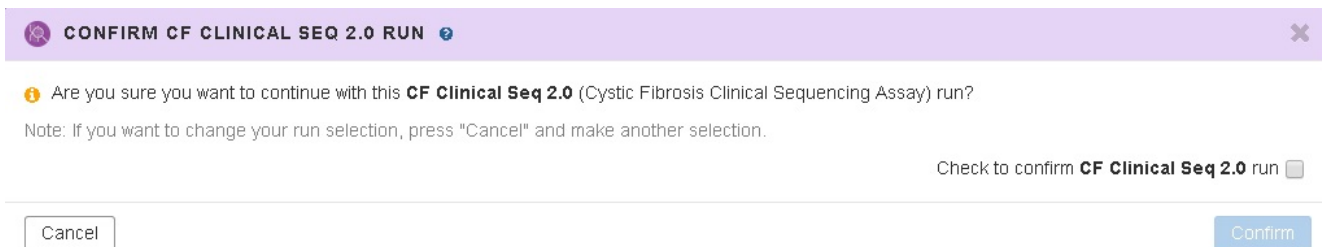
Modification d'une analyse

Pour obtenir des instructions sur la modification des renseignements de votre analyse avant le séquençage, consultez le *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)*.

Utilisation du module d'analyse 2.0 de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager

Définir les paramètres

- 1 Connectez-vous à Local Run Manager.
- 2 Sélectionnez **Create Run** (Créer l'analyse) et sélectionnez **CF Clinical** (séquençage clinique de la fibrose kystique).
Une fenêtre contextuelle s'affichera pour confirmer que **CF Clinical Seq 2.0** (séquençage clinique de la fibrose kystique) est bien la sélection prévue.



CONFIRM CF CLINICAL SEQ 2.0 RUN

Are you sure you want to continue with this **CF Clinical Seq 2.0** (Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay) run?

Note: If you want to change your run selection, press "Cancel" and make another selection.

Check to confirm **CF Clinical Seq 2.0** run ☐

Cancel Confirm

- 3 Cochez la case, puis sélectionnez **Confirm** (Confirmer) pour continuer (sinon, sélectionnez **Cancel** (Annuler) pour revenir à l'écran principal).
- 4 Entrez un nom qui désignera l'analyse, du séquençage jusqu'à la fin du processus.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des tirets de soulignement ou des tirets (40 caractères ou moins).
- 5 **[Facultatif]** Saisissez une description de l'analyse.
Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des tirets de soulignement ou des tirets (150 caractères ou moins).
- 6 Entrez le numéro de lot et la date de péremption de la trousse de préparation des librairies.

Sélection des échantillons à analyser

Précisez les échantillons à analyser en utilisant l'une des options suivantes :

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

Saisie manuelle des échantillons

- 1 Saisissez un nom d'échantillon unique dans le champ Sample Name (Nom de l'échantillon).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des tirets de soulignement (40 caractères ou moins).
- 2 Cliquez avec le bouton droit et sélectionnez les échantillons de contrôle positifs ou négatifs.
Afin d'enregistrer une analyse, elle doit avoir au moins un contrôle positif et un contrôle négatif.
- 3 **[Facultatif]** Entrez la description de l'échantillon à l'onglet Description.
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des tirets de soulignement (50 caractères ou moins).
- 4 **[Facultatif]** Sélectionnez un adaptateur d'index 1 dans la liste déroulante Index 1 (i7).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 se remplissent automatiquement avec une mise en page par défaut.
- 5 **[Facultatif]** Sélectionnez un adaptateur d'index 2 dans la liste déroulante Index 2 (i5).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 se remplissent automatiquement avec une mise en page par défaut.
- 6 Cliquez sur l'icône **Print** (Imprimer) pour afficher la présentation de la plaque.
- 7 Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer le schéma de la plaque comme référence pour la préparation des librairies.
- 8 **[Facultatif]** Sélectionnez **Export** (Exporter) pour exporter le fichier de renseignements sur l'échantillon.
- 9 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).
Si moins de 24 échantillons ont été saisis, la fenêtre Insufficient Sample (Échantillon insuffisant) s'affiche.
Sélectionnez **Proceed** (Procéder) pour continuer, ou sélectionnez **Cancel** (Annuler) pour modifier les échantillons.



ATTENTION

Le séquençage avec des librairies groupées qui contiennent moins de 24 échantillons n'est pas validé par Illumina.

Importation des échantillons

Les renseignements sur les échantillons peuvent être importés de deux types de fichiers :

- ▶ Un fichier de renseignements sur les échantillons qui a été exporté du module de séquençage clinique de la fibrose kystique en utilisant la fonction Export (Exporter).
- ▶ Un fichier de modèle, qui peut être généré en sélectionnant **Template** (Modèle) sur l'écran Create Run (Créer l'analyse). Le fichier de modèle contient les en-têtes de colonnes corrects pour l'importation, avec des renseignements fictifs dans chaque colonne. Utilisez un éditeur externe pour personnaliser le fichier de modèle :
 - 1 Ajoutez les renseignements sur chaque échantillon de l'analyse.
 - 2 Une fois que tous les renseignements sur les échantillon ont été ajoutés, supprimez tous les renseignements fictifs restants dans les cellules inutilisées.
 - 3 Enregistrez le fichier de modèle.

Pour importer les renseignements sur les échantillons :

- 1 Sélectionnez **Import Samples** (Importer les échantillons), puis cherchez le fichier et sélectionnez-le.
- 2 Cliquez sur l'icône **Print** (Imprimer) pour afficher la présentation de la plaque.
- 3 Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer le schéma de la plaque comme référence pour la préparation des bibliothèques.
- 4 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).
Si moins de 24 échantillons ont été saisis, la fenêtre Insufficient Sample (Échantillon insuffisant) s'affiche. Sélectionnez **Proceed** (Procéder) pour continuer, ou sélectionnez **Cancel** (Annuler) pour modifier les échantillons.



ATTENTION

Le séquençage avec des bibliothèques groupées qui contiennent moins de 24 échantillons n'est pas validé par Illumina.

Modification d'une analyse

Pour obtenir des instructions sur la modification des renseignements de votre analyse avant le séquençage, consultez le *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)*.

Préparation de bibliothèques



REMARQUE

Le flux de préparation des bibliothèques pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique est identique.

Hybridation du pool d'oligonucléotides

Consommables

- ▶ Plaque PCR à 96 puits
- ▶ Échantillons d'ADN génomique (ADNg)
- ▶ Tampon d'hybridation
- ▶ Échantillon de contrôle positif
- ▶ Pool d'oligos de la fibrose kystique
- ▶ Tampon TE
- ▶ Opercule adhésif en aluminium

Préparation

1 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Tampon d'hybridation	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez vigoureusement pour vous assurer que tous les précipités ont été complètement dissous, puis centrifugez brièvement les tubes pour recueillir le liquide.
Pool d'oligos de la fibrose kystique	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez vigoureusement pour vous assurer que tous les précipités ont été complètement dissous, puis centrifugez brièvement les tubes pour recueillir le liquide.

2 Ramenez les échantillons d'ADNg et l'échantillon témoin positif à température ambiante.

3 Réglez un bloc chauffant de 96 puits à 95 °C.

4 Préchauffez un incubateur à 37 °C.

Procédure

1 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits HYB.

2 Créez la plaque d'échantillon en fonction du graphique de la plaque imprimé dans Local Run Manager.

3 En suivant le schéma de disposition de la plaque générée par Local Run Manager, ajoutez un contrôle négatif de 5 µl (par exemple, un tampon TE) dans le puits approprié de la plaque HYB.

4 Ajoutez 5 µl d'échantillon ou de contrôle à 50 ng/µl (250 ng total) dans les puits appropriés dans la plaque HYB.

5 Ajoutez 5 µl des pools d'oligos de fibrose kystique à chaque puits d'échantillon.

6 Ajoutez 40 µl de tampon d'hybridation à chaque échantillon sur la plaque HYB.

7 Pipettez doucement vers le haut et le bas trois à cinq fois pour mélanger.

8 Scellez la plaque HYB et centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.

9 Placez la plaque HYB dans le bloc préchauffé à 95 °C et incubez pendant une minute.

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

Le refroidissement est essentiel pour une hybridation adéquate.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

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

Retrait des oligonucléotides non liés

Consommables

- ▶ Mélange extension-ligation
- ▶ Plaque filtrante
- ▶ Tampon de lavage rigoureux
- ▶ Tampon de lavage universel
- ▶ Plaque MIDI

Préparation

1 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Mélange extension-ligation	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger.
Tampon de lavage rigoureux	de 2 à 8 °C	Amenez à température ambiante. Agitez vigoureusement. Veillez à ce que tous les précipités soient dissous.
Tampon de lavage universel	de 2 à 8 °C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger.

2 Assemblez l'unité d'assemblage de la plaque filtrante (**FPU**) *de haut en bas* :

- Couvercle
- Plaque filtrante
- Collier adaptateur
- Plaque MIDI

3 Lavez au préalable la membrane de la plaque filtrante comme suit :

- a Ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux dans chaque puits.
- b Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.

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



ATTENTION

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

Procédure

- 1 Retirez la plaque HYB du bloc chauffant et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute.
- 2 À l'aide d'une pipette multi-canaux réglée sur 55 µl, transférez le volume entier de chaque échantillon des puits prélevés correspondants de la plaque filtrante.
- 3 Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.
- 4 Lavez la plaque filtrante comme suit.
 - a Ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux dans chaque puits d'échantillon.
 - b Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.
- 5 Lavez la plaque une **deuxième** fois.
- 6 Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore à 2 400 × g à 20 °C jusqu'à ce que tout le liquide ait disparu (cinq à dix minutes supplémentaires).
- 7 Jetez tout liquide circulant, puis réassemblez la FPU.
- 8 Ajoutez 45 µl de tampon de lavage universel dans chaque puits d'échantillon.
- 9 Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant 10 minutes.
- 10 Veillez à ce que tout liquide soit vidé après la centrifugation. Répétez la centrifugation si nécessaire.

Extension-ligation des oligonucléotides liés

Consommables

- ▶ Mélange extension-ligation
- ▶ Opercule adhésif en aluminium

Procédure

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

Amplification PCR

Consommables

- ▶ Plaque PCR à 96 puits
- ▶ Scellant à plaque PCR
- ▶ Primer d'index (A501–A508 et A701–A712)
- ▶ NaOH 10 N
- ▶ Mélange maître PCR
- ▶ Polymérase PCR
- ▶ Tube conique de 15 ml

Préparation

- 1 Déterminez les primers d'index à utiliser selon le schéma de disposition du graphique de la plaque dans Local Run Manager.
- 2 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Primer d'index (A501–A508 et A701–A712)	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
Polymérase PCR	de -25 à -15 °C	Laissez le tout dans le congélateur jusqu'au moment de préparer la solution de travail PCR.
Mélange maître PCR	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

- 3 Préparez une nouvelle solution de NaOH de 0,05 N en ajoutant 25 µl de NaOH de 10 N à 4 975 µl d'eau sans DNase ni RNase.
- 4 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits.
- 5 Ajoutez des primers d'index à la plaque d'amplification comme suit :
 - a Ajoutez 4 µl des primers d'index 2 sélectionnés (A 501-A508) au puits approprié dans une colonne de la plaque AMP.
 - b Mettez au rebut les bouchons blancs d'origine, puis utilisez des bouchons blancs neufs.
 - c Ajoutez 4 µl des primers d'index 1 sélectionnés (A701–A712) à la rangée appropriée de la plaque AMP.
 - d Mettez au rebut les bouchons orange d'origine et utilisez des bouchons orange neufs.

6 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Polymérase PCR	de -25 à -15 °C	Retirez du stockage et centrifugez brièvement. Procédez tout de suite à l'étape suivante. Si la polymérase PCR doit être utilisée pour des préparations supplémentaires, il faut la remettre en stock après avoir créé une solution de travail PCR.

7 Préparez la solution de travail comme suit.



REMARQUE

Les instructions ci-dessous indiquent les volumes nécessaires pour traiter 96 échantillons. Si ce nombre d'échantillons n'est pas atteint, ajustez les volumes en conséquence pour préserver les réactifs.

- a Pour 96 échantillons, ajoutez 56 µl de polymérase PCR à 2,8 ml de mélange maître PCR.
- b Retournez 20 fois pour mélanger.

La solution de travail PCR est stable à température ambiante pendant dix minutes.

Procédure

- 1 Retirez la plaque FPU de l'incubateur, puis enlevez l'opercule.
- 2 Couvrez la plaque filtrante avec le couvercle et centrifugez à 2 400 x g à 20 °C pendant deux minutes.
- 3 Ajoutez 25 µl de NaOH de 0,05 N à chaque puits sur la plaque filtrante.
- 4 Pipettez la solution de haut en bas cinq à six fois.
- 5 Recouvrez la plaque filtrante avec le couvercle, puis incubez à température ambiante pendant cinq minutes.
- 6 Pendant que la plaque filtrante est en incubation, transférez 22 µl du mélange maître à chaque puits de la plaque AMP contenant des primers d'index.
- 7 Transférez les échantillons élués du filtre à la plaque AMP comme suit.
 - a Pipettez les échantillons de la première colonne de la plaque filtrante de haut en bas cinq à six fois.
 - b Transférez 20 µl de la plaque filtrante à la colonne correspondante de la plaque d'amplification.
 - c Pipettez doucement de haut en bas cinq à six fois pour combiner soigneusement l'ADN au mélange maître PCR.
 - d Répétez les étapes de transfert pour les autres colonnes de la plaque filtrante à la plaque d'amplification.
- 8 Scellez la plaque AMP et fixez-la avec un rouleau en caoutchouc.
- 9 Centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 10 Transférez la plaque AMP vers la zone de postamplification.
- 11 Réalisez la PCR en utilisant le programme suivant sur un thermocycleur :
 - ▶ 95 °C pendant trois minutes
 - ▶ 25 cycles de :
 - ▶ 95 °C pendant 30 secondes
 - ▶ 62 °C pendant 30 secondes
 - ▶ 72 °C pendant 60 secondes
 - ▶ 72 °C pendant cinq minutes
 - ▶ Maintenez à 10 °C

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

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

Nettoyage PCR

Consommables

- ▶ Tube conique de 50 ml
- ▶ Adhésif de plaque à usage unique
- ▶ Deux plaques MIDI
- ▶ Tampon d'élution
- ▶ Billes de nettoyage PCR

Préparation

- 1 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Billes de nettoyage PCR	de 2 à 8 °C	Laissez les billes reposer pendant 30 minutes pour qu'elles atteignent la température ambiante.

- 2 Pour 96 échantillons, préparez de l'éthanol frais à 80 % en utilisant 36 ml d'EtOH absolu et 9 ml d'eau sans DNase ni RNase. Bien mélanger.



REMARQUE

Si moins de 96 échantillons sont traités, ajustez les volumes en conséquence pour préserver les réactifs.

Procédure

- 1 Centrifugez la plaque AMP à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 2 Ajoutez une étiquette à une nouvelle plaque MIDI CLP.
- 3 Renversez les billes de nettoyage PCR 10 fois. Mélangez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis retournez 10 fois de plus. Inspectez visuellement la solution pour vous assurer que les billes sont remises en suspension.
- 4 Ajoutez 45 µl de billes de nettoyage PCR dans chaque puits de la plaque CLP.
- 5 Transférez la totalité du produit PCR de chaque puits de la plaque AMP au puits correspondant de la plaque CLP.
- 6 Scellez la plaque et secouez-la sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Incubez à température ambiante sans secouer pendant 10 minutes.
- 8 Remplacez la plaque sur un support magnétique et attendez que le liquide soit clair (environ 2 minutes).
- 9 Pendant que la plaque CLP est sur le support magnétique, retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
- 10 Lavez les billes comme suit.
 - a Conservez-les sur le support magnétique et ajoutez 200 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque puits.
 - b Attendez au moins 30 secondes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
 - c Retirez tout le surnageant de chaque puits et mettez-le au rebut.
- 11 Lavez les billes une **deuxième** fois.
- 12 Utilisez une pipette multicanaux P20 réglée à 20 µl pour retirer l'excès d'EtOH.
- 13 Retirez la plaque CLP du support magnétique et séchez les billes à l'air libre pendant 10 minutes.
- 14 Ajoutez 30 µl de tampon d'élution dans chaque échantillon.
- 15 Scellez la plaque CLP et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant deux minutes. Après l'avoir secouée, vérifiez si les échantillons ont été remis en suspension. Dans le cas contraire, répétez cette étape.
- 16 Incubez à température ambiante pendant deux minutes.

- 17 Remplacez la plaque CLP sur le support magnétique et attendez que le sumageant soit clair (environ 2 minutes).
- 18 Ajoutez une étiquette à une nouvelle plaque MIDI LNP.
- 19 Transférez 20 µl de sumageant de chaque puita de la plaque CLP au puita correspondant de la plaque LNP.
- 20 [Facultatif] Transférez les 10 µl restants du sumageant de la plaque **CLP** à la nouvelle plaque et étiquetez la plaque avec le nom et la date d'analyse. Conservez cette plaque entre -25 °C et -15 °C jusqu'à la fin de l'analyse de séquençage et de l'analyse de données. Les produits PCR nettoyés peuvent être utilisés pour des efforts de dépannage en cas de pannes d'échantillon.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

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

Normalisation et regroupement de la librairie

Consommables

- ▶ Tube conique de 15 ml
- ▶ Plaque PCR à 96 puits
- ▶ Tubes microcentrifuges
- ▶ Billes de librairie
- ▶ Tampon de dilution de librairie
- ▶ Diluant de normalisation de librairie
- ▶ Lavage de normalisation de librairie
- ▶ NaOH 10 N
- ▶ Eau sans DNase ni RNase

Préparation

- 1 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Billes de librairie	de 2 à 8 °C	Amenez à température ambiante.
Tampon de dilution de librairie	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez vigoureusement. Veillez à ce que tous les précipités soient dissous.
Diluant de normalisation de librairie	de -25 à -15 °C	Amenez à température ambiante. Agitez vigoureusement. Veillez à ce que tous les précipités soient dissous.
Lavage de normalisation de librairie	de 2 à 8 °C	Amenez à température ambiante. Agitez vigoureusement.

- 2 Préparez une nouvelle solution de NaOH de 0,1 N en ajoutant 50 µl de NaOH de 10 N à 4950 µl d'eau sans DNase ni RNase.

Procédure

- 1 Mélangez le diluant de normalisation de librairie et les billes de librairie dans un nouveau tube conique de 15 ml comme suit :



REMARQUE

Les instructions ci-dessous indiquent les volumes nécessaires pour traiter 96 échantillons. Si ce nombre d'échantillons n'est pas atteint, ajustez les volumes en conséquence pour préserver les réactifs.

- a Dans le cas de 96 échantillons, ajoutez 4,4 ml diluant de normalisation de librairie.

- b Mélangez vigoureusement les billes de librairie pendant une minute avec inversion intermittente jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension et qu'aucun culot ne se trouve au fond du tube lorsque celui-ci est retourné.
- c Pipettez les billes de librairie de haut en bas 10 fois pour les remettre en suspension.



ATTENTION

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

- d Pour 96 échantillons, pipettez 800 µl de billes de librairie dans le tube contenant le diluant de normalisation de librairie.
 - e Mélangez en retournant le tube 15 à 20 fois.
- 2 Ajoutez 45 µl de la solution de travail de billes de librairie et de diluant de normalisation de librairie dans chaque puits de la plaque LNP.
 - 3 Scellez la plaque et secouez-la sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.



REMARQUE

Si vous comptez procéder au séquençage le jour même, commencez la décongélation de la cartouche de réactifs. Suivez les instructions de décongélation de la cartouche de réactifs MiSeqDx qui se trouvent à la section *Préparation du séquençage des librairies*, page 32.

- 4 Remplacez la plaque LNP sur le support magnétique et attendez que le liquide soit clair (environ 2 minutes).
- 5 Pendant que la plaque LNP est sur le support magnétique, retirez avec précaution le surnageant et mettez-le au rebut.
- 6 Retirez la plaque LNP du support magnétique et lavez les billes avec le lavage de normalisation de librairie comme suit :
 - a Ajoutez 45 µl de lavage de normalisation de librairie dans chacun des puits d'échantillon.
 - b Scellez la plaque LNP et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant cinq minutes.
 - c Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
 - d Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
- 7 Répétez la procédure de lavage de normalisation de librairie comme décrit à l'étape précédente.
- 8 Utilisez une pipette multi-canaux P20 réglée sur 20 µl pour retirer l'excès de lavage de normalisation de librairie.
- 9 Retirez la plaque LNP du support magnétique, puis ajoutez 30 µl de la solution de NaOH de 0,1 N dans chaque puits.
- 10 Scellez la plaque LNP et secouez sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant cinq minutes.
- 11 Pendant l'élution de cinq minutes, étiquetez une nouvelle plaque PCR à 96 puits SGP.
- 12 Ajoutez 30 µl de tampon de stockage de librairie dans chaque puits.
- 13 Assurez-vous que tous les échantillons de la plaque LNP sont complètement resuspendus. Si les échantillons ne sont pas complètement resuspendus, pipettez doucement ces échantillons de haut en bas ou tapotez doucement la plaque sur la paillasse, puis secouez-la pendant encore cinq minutes.
- 14 Placez la plaque LNP sur le support magnétique pendant au moins deux minutes.
- 15 À l'aide d'une pipette multi-canaux réglée sur 30 µl, transférez le surnageant de la plaque LNP à la plaque SGP. Pipettez doucement de haut en bas cinq fois pour mélanger.
- 16 Scellez la plaque SGP et centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 17 Agitez le tampon de dilution de librairie et assurez-vous que tous les précipités sont complètement dissous. Centrifugez brièvement pour recueillir le contenu.
- 18 Étiquetez un nouveau tube microcentrifuge PAL.

- 19 Déterminez les échantillons à regrouper pour le séquençage. Un maximum de 96 échantillons peut être regroupé pour le séquençage.
- 20 Transférez 5 µl de chaque librairie à séquencer de chaque puits de la plaque SGP, colonne par colonne, au puits correspondant de la barrette de huit tubes PCR.
- 21 Transférez les contenus de la barrette de huit tubes PCR dans le tube PAL. Agitez vigoureusement le tube PAL jusqu'à ce que sont contenu soit complètement mélangé.
- 22 Scellez la plaque SGP avec un timbre adhésif pour plaques et apposez-y une étiquette avec le nom et la date de l'analyse.



REMARQUE

La plaque SGP peut être entreposée entre -25 °C et -15 °C pendant tout au plus 3 jours et utilisée pour regrouper des librairies, si nécessaire.

- 23 Étiquetez 2 ou 3 nouveaux tubes microcentrifuges DAL.
- 24 Ajoutez 585 µl de tampon de dilution de librairie aux tubes DAL.
- 25 Transférez 9 µl du PAL dans chaque tube DAL contenant le tampon de dilution de librairie.
- 26 Pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et assurer un transfert complet.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous ne procédez pas immédiatement au séquençage sur l'instrument MiSeqDx, stockez les tubes DAL à une température comprise entre -25 °C et -15 °C pendant 28 jours au maximum.

Séquençage de librairie



REMARQUE

Le flux de séquençage des librairies pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique est identique.

Préparation du séquençage des librairies

Consommables

- ▶ Trousse de réactifs MiSeqDx v3
- ▶ Tampon de dilution de librairie
- ▶ Librairie de contrôle interne PhiX

Préparation

- 1 Réglez sur 96 °C un bloc chauffant adapté aux tubes de centrifugeuse de 1,5 ml.
- 2 Dans un seau à glace, préparez un bain d'eau glacée.
- 3 Préparez les consommables suivants :

Réactif	Stockage	Directives
Tampon de dilution de librairie	de -25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger. Veillez à ce que tous les précipités soient dissous. Centrifugez brièvement et placez dans un bain d'eau glacée. Un tampon de dilution de librairie supplémentaire est fourni avec la trousse de réactifs MiSeqDx v3 si nécessaire.
Contrôle interne PhiX	de -25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Placez dans un bain de glace.
Cartouche de réactifs MiSeqDx v3	de -25 à -15 °C	Laissez la cartouche décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ 90 minutes ou jusqu'à décongélation complète. Pour plus de renseignements sur la préparation des cartouches de réactifs, consultez le Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 100000021961).

Réactif	Stockage	Directives
Flow Cell MiSeqDx	de 2 à 8 °C	Amenez à température ambiante. Pour plus de renseignements sur la préparation des Flow Cells, consultez le Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 1000000021961).
Solution SBS (PR2) MiSeqDx	de 2 à 8 °C	Amenez à température ambiante. Pour plus de renseignements sur la préparation de la solution SBS, consultez le Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 1000000021961).

Dénaturation et dilution du contrôle interne PhiX

Consommables

- ▶ Eau sans DNase/RNase
- ▶ NaOH 10 N
- ▶ Tampon de dilution de librairie
- ▶ Librairie de contrôle interne PhiX
- ▶ Tampon TE
- ▶ Tube conique de 15 ml
- ▶ Tubes microcentrifuges

Préparation

- 1 Dans un tube conique, combinez les volumes suivants pour préparer une solution NaOH 0,1 N :
 - ▶ Eau sans RNase/DNase (2 475 µl)
 - ▶ Stockez la solution de NaOH de 10 N(25 µl)
- 2 Retournez le tube plusieurs fois pour mélanger.



ATTENTION

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

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

- 3 Combinez les volumes suivants pour diluer la librairie de contrôle interne PhiX de 2 nmol :
 - ▶ Librairie de contrôle interne PhiX de 10 nM (2 µl)
 - ▶ Tampon 1X TE (8 µl)
- 4 Combinez les volumes suivants pour préparer une librairie de contrôle interne PhiX 1 nmol :
 - ▶ Librairie de contrôle interne PhiX de 2 nM (10 µl)
 - ▶ NaOH de 0,1 N (10 µl)
- 5 Agitez brièvement pour mélanger.
- 6 Centrifugez le contrôle interne PhiX de 1 nmol à 280 × g à 20 °C pendant une minute.
- 7 Incubez pendant cinq minutes à température ambiante pour dénaturer la solution de la librairie de contrôle interne PhiX en brins uniques.
- 8 Dans un nouveau tube de microcentrifugeuse, combinez les volumes suivants afin de préparer une librairie de contrôle interne PhiX de 20 pmol :
 - ▶ Librairie de contrôle interne PhiX dénaturée (2 µl)
 - ▶ Tampon de dilution de librairie préalablement réfrigéré (98 µl)



ATTENTION

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

Préparation des échantillons pour le séquençage

- 1 Procédez avec un tube DAL pour le séquençage.
- 2 Si le tube DAL a été conservé congelé, laissez-le décongeler complètement et mélangez-le en pipettant de haut en bas.
- 3 Si le contrôle interne PhiX 20 pM a été stocké congelé, retirez l'aliquote à usage unique, décongelez complètement, agitez vigoureusement, puis centrifugez brièvement.
- 4 Ajoutez 6 µl de contrôle interne PhiX 20 pmol au tube DAL.
- 5 Pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et assurer un transfert complet.
- 6 Mélangez le tube DAL sous agitateur vortex à vitesse maximale.
- 7 Centrifugez le tube DAL à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute.
- 8 Incubez le tube DAL sur un bloc chauffant à 96 °C pendant deux minutes.
- 9 Après l'incubation, retournez le tube DAL une ou deux fois pour mélanger, puis placez-le immédiatement dans un bain d'eau glacée.
- 10 Gardez le tube DAL (les librairies regroupées) dans le bain d'eau glacée pendant cinq minutes.

Chargement des librairies regroupées sur la cartouche

- 1 Utilisez une nouvelle pointe de pipette de 1 ml pour percer l'opercule en aluminium scellant le réservoir sur la cartouche de réactifs étiquetée Load Samples (Charger les échantillons).
- 2 À l'aide de la pipette, transférez 600 µl du tube DAL dans le réservoir Load Samples (Charger les échantillons). Évitez tout contact avec l'opercule en aluminium.
- 3 Vérifiez s'il y a des bulles d'air dans le réservoir après le chargement de l'échantillon. Si des bulles d'air sont présentes, tapotez légèrement la cartouche sur la paillasse pour les libérer.
- 4 Passez directement à la configuration de l'analyse depuis l'interface du logiciel d'exploitation MiSeq (MOS). Pour plus de renseignements sur la configuration d'une analyse sur le système MiSeqDx, consultez le *Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 1000000021961)*.

Lavage après analyse incluant le lavage de la ligne de modèle

Après le séquençage, il est fortement recommandé d'effectuer un lavage après analyse ainsi qu'un lavage de la ligne du modèle.



ATTENTION

Si le lavage des lignes du modèle n'est pas effectué, les débits d'appels de contrôle négatifs pourraient être affectés lors de l'analyse ultérieure.



REMARQUE

Le flux de travail du lavage après analyse pour le test de 139 variants de la fibrose kystique et le test de séquençage clinique de la fibrose kystique est identique.

Consommables

- ▶ Tubes microcentrifuges
- ▶ Eau de laboratoire
- ▶ Tween 20
- ▶ Hypochlorite de sodium 5 %
- ▶ Tube MiSeq

**AVERTISSEMENT**

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

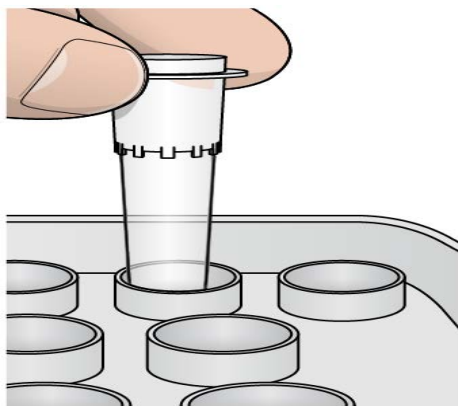
Préparation

- 1 Préparez une nouvelle solution de lavage avec du Tween 20 et de l'eau de laboratoire, comme suit.
 - a Ajoutez 5 ml de Tween 20 à 100 % dans 45 ml d'eau de laboratoire. Ces volumes permettent d'obtenir du Tween 20 à 10 %.
 - b Ajoutez 25 ml de Tween 20 à 10 % dans 475 ml d'eau de laboratoire. Ces volumes permettent d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,5 %.
 - c Retournez cinq fois pour mélanger.
- 2 Préparez une nouvelle solution de lavage à l'hypochlorite de sodium avec de l'eau de laboratoire, comme suit.
 - a Ajoutez 36 µl d'hypochlorite de sodium à 5 % à 864 µl d'eau de laboratoire. Ces volumes permettront d'obtenir une dilution d'hypochlorite de sodium à 1:25.
 - b Ajouter 50 µl d'hypochlorite de sodium dilué à 1:25 à 950 µl d'eau de laboratoire dans un tube MiSeq.
- 3 Il est important d'utiliser la bonne concentration d'hypochlorite de sodium. Vérifiez le pourcentage d'hypochlorite de sodium sur l'étiquette du produit. Si la concentration est trop élevée, la génération d'amplifiats peut échouer lors des analyses suivantes. Si vous ne disposez pas d'hypochlorite de sodium à 5 %, préparez 1 ml de solution d'hypochlorite de sodium à 0,01 % dans de l'eau de laboratoire. N'utilisez pas d'hypochlorite de sodium lors d'un lavage de maintenance ou d'un lavage de mise en veille.
- 4 Préparez les composants de lavage avec une nouvelle solution de lavage, comme suit :
 - a Ajoutez 6 ml de solution de lavage dans chaque réservoir du plateau de lavage.
 - b Ajoutez 350 ml de solution de lavage dans le flacon de lavage de 500 ml.

Procédure

- 1 Insérez le tube MiSeq qui contient la solution de lavage d'hypochlorite de sodium à 0,01 % dans la position 17 du plateau de lavage jusqu'à ce que le col du tube soit à la même hauteur que le plateau. Le tube déplace de la position 17 la solution de lavage à base de Tween 20 et d'eau de laboratoire.

Figure 2 Tube MiSeq à la position 17 du plateau de lavage





ATTENTION

Veillez à insérer le tube MiSeq contenant l'hypochlorite de sodium seulement à la position 17 du plateau. L'insertion du tube à une autre position pourrait entraîner l'échec de la génération d'amplifiats lors des analyses suivantes.

- 2 Une fois l'analyse terminée, sélectionnez **Start Wash** (Démarrer le lavage).
Le logiciel lève automatiquement les dispositifs d'aspiration dans le réfrigérant pour réactifs.
- 3 Sélectionnez **Perform optional template line wash** (Procéder au lavage facultatif de la ligne des modèles) à l'écran Post-Run Wash (Lavage après analyse).
- 4 Ouvrez la porte du compartiment des réactifs et celle du réfrigérant pour réactifs, puis faites glisser la cartouche de réactifs usagée du réfrigérant.
- 5 Faites glisser le plateau de lavage dans le réfrigérant pour réactifs jusqu'à ce qu'il s'arrête, puis fermez la porte du réfrigérant pour réactifs.
- 6 Relevez la poignée des dispositifs d'aspiration du flacon de solution SBS MiSeqDx et du flacon à déchets jusqu'à ce qu'elle se verrouille.
- 7 Retirez le flacon de solution SBS MiSeqDx et remplacez-le par le flacon de lavage.
- 8 Retirez le flacon à déchets et jetez son contenu de manière appropriée. Remettez le flacon à déchets dans le compartiment des réactifs.
- 9 Abaissez doucement la poignée du dispositif d'aspiration. Vérifiez que les dispositifs d'aspiration descendent dans le flacon à déchets.
- 10 Fermez la porte du compartiment des réactifs.
- 11 Sélectionnez **Next** (Suivant). Le lavage après analyse commence.
- 12 Une fois le lavage terminé, laissez la Flow Cell usagée, le plateau de lavage et le flacon de lavage qui contient le reste de la solution de lavage sur l'instrument.
- 13 Les dispositifs d'aspiration restent en position basse, ce qui est normal. Laissez la solution de lavage inutilisée sur le plateau de lavage et dans le flacon de lavage, afin d'empêcher les dispositifs d'aspiration de se dessécher et l'air de pénétrer dans le système.

Réanalyse des bibliothèques séquencées

Après une analyse de séquençage, la réanalyse du même ensemble de données de séquençage peut être effectuée en suivant la procédure *Requeue Analysis* (Remise en file d'attente de l'analyse) du *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)*. La remise en file d'attente de l'analyse est limitée au module utilisé à l'origine pour effectuer le séquençage. La remise en file d'attente de l'analyse permettra d'effectuer des vérifications afin de prélever des renseignements et de générer de nouveaux rapports.



REMARQUE

Les bibliothèques groupées utilisées pour le séquençage doivent avoir de 24 à 96 échantillons. Les rapports pour un sous-ensemble d'échantillons peuvent être obtenus en saisissant moins d'échantillons lors de la configuration de la remise en file d'attente. Les rapports ne seront générés que pour les échantillons saisis lors de la configuration de la remise en file d'attente.

Options de nouveau test pour les bibliothèques regroupées

Le test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight utilise le même flux de préparation des bibliothèques et les mêmes réactifs que le test de séquençage clinique de la fibrose kystique TruSight. La procédure de préparation des bibliothèques exige de sélectionner un test avant de commencer. Toutefois, dans les cas où les bibliothèques groupées (tubes DAL) nécessitent des tests supplémentaires (par exemple, la répétition d'une analyse de séquençage ou d'un test réflexe avec un autre test TruSight CF), les tubes DAL peuvent être utilisés selon les besoins sans répéter la préparation des bibliothèques. Pour effectuer un nouveau test, suivez la procédure ci-dessous :

**REMARQUE**

Les bibliothèques groupées utilisées pour le séquençage doivent avoir au moins de 24 à 96 échantillons. Les rapports pour un sous-ensemble d'échantillons peuvent être obtenus en saisissant moins d'échantillons lors de la configuration de l'analyse de séquençage. Tous les échantillons regroupés seront séquencés, mais les rapports ne seront générés que pour les échantillons saisis lors de la configuration de l'analyse de séquençage.

- 1 Configurez l'analyse en suivant les instructions de la section *Sélection des tests et configuration de l'analyse, page 21*
- 2 Séquencez les bibliothèques en suivant les instructions de la section *Séquençage de bibliothèque, page 32*.
- 3 Une fois l'analyse du séquençage terminée, lavez l'instrument MiSeqDx en suivant les instructions de la section *Lavage après analyse incluant le lavage de la ligne de modèle, page 34*.

Interprétation des résultats du test de 139 variants de la fibrose kystique

- ▶ Le test de 139 variants de la fibrose kystique est conçu pour détecter 139 des variants du CFTR, y compris ceux recommandés par l'ACMG (*Tableau 2*).
- ▶ Le rapport des tests répertorie les noms d'échantillons et le génotype pour chaque variant détecté pour un échantillon.
 - ▶ Tous les échantillons sont interrogés pour 134 variants provoquant la fibrose kystique et le variant R117H recommandé par l'ACMG. Seuls les allèles ayant subi une mutation sont répertoriés dans le rapport des tests.
 - ▶ Le variant PolyTG/PolyT est rapporté uniquement si la variation R117H est identifiée pour un échantillon. Pour les patients présentant un variant R117H, des tests supplémentaires doivent être effectués pour déterminer si un variant PolyTG/PolyT, qui peut affecter le phénotype clinique (p. ex., 12-13[TG] ou 5T), présente une orientation cis/trans sur le variant R117H.

**REMARQUE**

Le génotype PolyTG/PolyT est déterminé par le test de 139 variants de la fibrose kystique en se basant sur le nombre de lectures des génotypes les plus courants. En raison de la nature numérique du séquençage de nouvelle génération, le test permet d'atteindre un niveau élevé de précision à partir de plusieurs observations par rapport à d'autres technologies basées sur le séquençage qui utilisent seulement quelques observations.

- ▶ Lorsqu'un échantillon présente un génotype F508del ou I507del homozygote, si un ou plusieurs des trois polymorphismes bénins I506V, I507V et F508C sont détectés, cela est rapporté pour l'échantillon. Si les trois polymorphismes bénins sont tous de type sauvage, le rapport indique que les variants I506V, I507V et F508C ne sont pas présents pour l'échantillon.

**REMARQUE**

Étant donné qu'il s'agit d'un test basé sur le séquençage, il n'existe aucune interférence avec la signalisation de la mutation F508del ou I507del en raison des trois polymorphismes bénins. Par conséquent, aucune correction n'est apportée au résultat détecté.

- ▶ Lorsqu'un échantillon est identifié comme hétérozygote et les allèles de type sauvage et mutant sont détectés pour l'échantillon, le résultat du génotype est rapporté comme HET.
- ▶ Lorsqu'un échantillon est identifié comme homozygote et seul l'allèle mutant est détecté pour l'échantillon, le résultat du génotype est rapporté comme HOM.
- ▶ Si aucun variant n'est identifié pour un échantillon, le rapport indique « No panel variants are detected » (Aucun variant de panel n'a été détecté).
- ▶ Le rapport des tests fournit des renseignements relatifs au débit d'appel d'échantillon pour chaque échantillon. Le débit d'appel est calculé comme suit : nombre de positions/régions de variants qui correspondent à un seuil de valeur de confiance prédéfinie divisé par le nombre total de positions/régions interrogées.

- ▶ Pour des échantillons nécessitant des signalements conditionnels, les variants supplémentaires interrogés sont également pris en compte dans le calcul du débit d'appel.
- ▶ Tout variant présentant une valeur de confiance prédéfinie inférieure au seuil est rapporté comme un « No call » (Aucun appel). Il est recommandé de répéter l'échantillon.
- ▶ Un résultat d'échantillon est considéré comme étant valide uniquement si le débit d'appel est $\geq 99\%$. Si le débit d'appel est inférieur à 99% , la performance est rapportée comme « Fail » (Échec), et l'échantillon doit être répété.



REMARQUE :

Si le taux d'appel d'échantillon est $< 50\%$, la performance est rapportée comme « Fail » (Échec) et la mention « Sample Failed » (Échec de l'échantillon) est indiquée sur le rapport. Aucun renseignement relatif aux variants ne sera affiché. Cet échantillon doit être répété.

- ▶ Il est recommandé de soumettre les variants validés à l'aide d'échantillons synthétiques (voir le tableau de précision) à une vérification par l'utilisateur au moyen d'une méthode de référence avant de rapporter les premiers résultats de patient avec ces variants.
- ▶ Si deux variants ou plus sont identifiés pour un échantillon, il est recommandé que l'utilisateur vérifie le résultat en répétant l'échantillon à l'aide du test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight avec un nouvel extrait d'ADNg pour écarter une contamination croisée de l'échantillon.



REMARQUE

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

- ▶ Toutes les interprétations des variants doivent être effectuées par un généticien moléculaire clinique diplômé ou équivalent, conformément aux directives et procédures locales¹⁵. Les références d'interprétation possibles comprennent, sans toutefois s'y limiter, la base de données CFTR2¹¹, l'article Sosnay¹³, les lignes directrices de 2004 de l'ACMG¹ et les avis de comités de 2011 de l'ACOG². Pour obtenir des renseignements sur le calcul et la présentation des résultats, ou pour obtenir une description du contenu dans un rapport texte, consultez les guides du logiciel d'analyse installé sur votre MiSeqDx. Pour Local Run Manager, consultez le *guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)* et le *guide du flux de travail du module d'analyse 2.0 du test de 139 variants de la fibrose kystique dans Local Run Manager (document n° 1000000100945)*.

Interprétation des résultats du test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique est conçu pour séquencer toutes les régions de codage de protéine dans le gène CFTR à travers les 27 exons, de 5 à 30 bases de séquence intronique adjacente, ~100 nt de séquence adjacente au 5' UTR et 3' UTR et 2 mutations introniques profondes (1 811 + 1,6 kbA > G, 3 489 + 10 kbC > T). Le **Tableau 3** dresse la liste des régions séquencées exactes. En outre, le test présente également des rapports sur le variant PolyTG/PolyT et deux grandes délétions (CFTRdele2, 3, CFTRdele22, 23).

- ▶ Le rapport des tests répertorie les noms d'échantillons et le génotype pour chaque variant détecté pour un échantillon.
 - ▶ Les coordonnées génomiques, le nom d'ADNc selon la Human Genome Variation Society (HGVS) et le nom de protéine (si disponible) sont signalés pour chaque variant.
 - ▶ Le type de variant est identifié comme variant à simple nucléotide (SNV), variant de délétion/insertion (DIV), variant de PolyTG/PolyT (PolyTGPolyT) ou grande délétion (DEL).
 - ▶ Le typage génotypique (qu'il soit hétérozygote ou homozygote) peut être déduit des renseignements de base « de référence », qui fournissent la séquence de référence à ces coordonnées génomiques, et de la description de « résultat » qui donne les deux allèles sur la position génomique dans l'échantillon. Par exemple, si la référence est « G » et le résultat est « A/G », cela indique une modification G > A à cette

coordonnée génomique et que le génotype est hétérozygote pour l'allèle du variant. De même, si la référence est « G » et le résultat est « T/T », cela indique une modification G > T à cette coordonnée génomique et que le génotype est homozygote pour l'allèle du variant.

- ▶ La profondeur de séquençage à la position du variant est fournie dans le champ « Depth » (Profondeur) et la fréquence allélique dans la section « Frequency » (Fréquence).
- ▶ Le rapport des tests fournit des renseignements relatifs au débit d'appel d'échantillon pour chaque échantillon. Le débit d'appel est calculé comme suit : nombre de positions/régions de variants qui correspondent à un seuil de valeur de confiance prédéfinie divisé par le nombre total de positions/régions interrogées.
 - ▶ La coordonnée génomique pour toute position ou région dont la valeur de confiance est inférieure au seuil est répertoriée séparément dans la section « Coordinates not called » (Coordonnées non appelées). Les utilisateurs doivent évaluer les positions non appelées par rapport aux renseignements sur les variants pertinents, afin d'identifier des variants qui peuvent être manqués et leurs fréquences de population correspondantes pour déterminer s'il est nécessaire de répéter l'échantillon.
- ▶ Un résultat d'échantillon est considéré comme étant valide uniquement si le débit d'appel est $\geq 99\%$. Si le débit d'appel est inférieur à 99% , la performance est rapportée comme « Fail » (Échec), et l'échantillon doit être répété.
- ▶ Il est recommandé de soumettre les variants qui ne sont pas validés dans l'étude de précision (voir la section *Précision*, page 61) à une vérification par l'utilisateur au moyen d'une méthode de référence validée avant de rapporter les premiers résultats de patient avec ces variants.



REMARQUE

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

- ▶ Toutes les interprétations des variants doivent être effectuées par un généticien moléculaire clinique diplômé ou équivalent, conformément aux directives et procédures locales¹⁵. Les références d'interprétation possibles incluent, mais sans s'y limiter : la base de données CFTR2^{11,12}, l'article de Sosnay¹³, les directives de l'ACMG publiées en 2004¹ et l'avis du comité ACOG de 2011².
Pour obtenir des renseignements sur le calcul et la présentation des résultats, ou pour obtenir une description du contenu dans un rapport texte, consultez les guides du logiciel d'analyse installé sur votre MiSeqDx. Pour Local Run Manager, consultez le *Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (Document n° 1000000011880)* et le *Guide de flux de travail pour le module d'analyse 2.0 de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager (document n° 1000000100946)*.
- ▶ Le généticien utilisera le logiciel Local Run Manager pour entrer une valeur d'interprétation pour chaque variant signalé sur un échantillon à l'aide d'un menu déroulant. Les choix des valeurs d'interprétation sont les suivants : CF-causing (cause la FK), Mutation of varying clinical consequence (mutation de conséquence clinique variable), Mutation of unknown significance (mutation d'importance inconnue) ou Non-CF causing (ne cause pas la FK). La valeur entrée doit être annexée au fichier de résultats et affichée dans la colonne d'interprétation sur le rapport de test de séquençage clinique.

Procédures de contrôle qualité

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

- **Contrôle négatif (NTC ou Contrôle de modèle négatif) :** l'utilisation d'un contrôle négatif est requise pour chaque analyse, de façon à détecter les cas possibles de contamination. Le débit d'appel pour le contrôle négatif doit être inférieur à 10% . Si un contrôle négatif génère un débit d'appel $> 10\%$ et que le lavage des lignes du modèle a été effectué pour l'analyse précédente, cela signifie qu'une contamination a peut-être eu lieu durant le traitement du test. Le test est considéré comme un échec et le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de librairie. L'échantillon de contrôle négatif est rapporté comme « Pass » (Réussite) s'il génère un débit d'appel $\leq 10\%$ et comme « Fail » (Échec) si le débit d'appel est $> 10\%$.



REMARQUE

Il est essentiel d'effectuer le lavage des lignes du modèle après chaque séquençage afin d'éviter un taux élevé d'appels de contrôle négatifs. Si un contrôle négatif génère un débit d'appel > 10 % et que le lavage des lignes du modèle a été effectué pour l'analyse précédente, il est recommandé à l'opérateur d'effectuer un lavage après analyse avec lavage de la ligne du modèle et de répéter l'analyse de séquençage.

- **Contrôles positifs** : un échantillon de contrôle positif d'ADN est requis pour chaque analyse. L'échantillon de contrôle positif d'ADN doit être un échantillon bien caractérisé présentant au moins un variant CFTR connu¹⁶. Illumina recommande d'alterner les contrôles positifs conformes aux normes techniques et directives de 2008 de l'ACMG (American College of Medical Genetics) pour les tests de mutation de la CF¹⁷ et aux normes de laboratoire clinique de 2013 de l'ACMG pour le séquençage de nouvelle génération¹⁸. L'échantillon de contrôle positif doit générer le génotype attendu. Si le contrôle positif génère un génotype différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. Le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de librairie. L'échantillon de contrôle positif est rapporté comme « Pass » (Réussite) s'il génère un débit d'appel ≤ 99 % et comme « Fail » (Échec) si le débit d'appel est > 99 %.
- **Contrôle de type sauvage** : l'échantillon de contrôle d'ADN de type sauvage est recommandé à chaque analyse. L'échantillon de contrôle de type sauvage doit être un échantillon correctement caractérisé ne contenant pas de variants CFTR. L'échantillon de contrôle de type sauvage doit générer le génotype attendu. Si le contrôle de type sauvage génère un génotype différent de celui attendu, alors il y a peut-être eu une erreur dans le suivi de l'échantillon ou un enregistrement incorrect des primers d'indexage. Le test entier doit être refait, en commençant par la préparation de librairie.
- Un résultat d'échantillon est considéré comme étant valide uniquement si le débit d'appel est ≥ 99 %. Si le débit d'appel est inférieur à 99 %, la performance est rapportée comme « Fail » (Échec), et l'échantillon doit être répété.
- Avant la première utilisation de ce produit dans le laboratoire de l'utilisateur, les performances du test doivent être vérifiées en testant un nombre d'échantillons positifs et négatifs possédant des caractéristiques de performances connues.
- Toutes les exigences de contrôle qualité doivent être suivies dans le respect des réglementations locales, régionales et/ou fédérales ou des conditions d'agrément.

Caractéristiques de performance du test de 139 variants de la fibrose kystique

Les caractéristiques de performance du test de 139 variants de la fibrose kystique se basent sur les études qui ont utilisé le test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx. L'équivalence entre les essais de TruSight et MiSeqDx est fourni dans la section *Équivalence de performance avec le test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina*, page 60.

Précision

La précision du test de 139 variants de la fibrose kystique a été évaluée au moyen de 500 échantillons représentant un large éventail de variants CFTR provenant de quatre sources distinctes. La source principale de données de précision était une étude de précision clinique menée en utilisant un panel de 366 échantillons. La majorité (n = 355) des échantillons comprenaient des échantillons d'ADNg cliniques archivés et anonymisés isolés à partir de sang humain. Les 11 échantillons restants ont été obtenus à partir d'échantillons de lignée cellulaire disponible sur le marché.

Les données provenant de cette étude ont été complétées par les données de précision de 68 échantillons de lignée cellulaire dans l'étude de reproductibilité, 14 échantillons cliniques de l'étude analytique d'évaluation de la méthode d'extraction et 52 échantillons de plasmide synthétique. Les plasmides synthétiques ont été conçus pour inclure le contexte génomique des variants rares, et contenaient partout entre un à neuf variants dans la

même structure. Ils ont été linéarisés, dilués en des nombres de copies équivalents d'ADN génomique, puis mélangés avec des échantillons d'ADN génomique humain présentant un génotype de type sauvage avec des nombres de copies équivalents pour imiter un échantillon hétérozygote.

Les résultats de génotypage pour les 137 petits sites InDel/SNV, comprenant la région PolyTG/PolyT ont été comparés à une analyse de séquence bidirectionnelle Sanger. Deux tests validés basés sur la PCR ont été utilisés comme méthode de référence pour les deux grandes délétions du panel. Chaque test duplex PCR a utilisé deux ensembles de primer pour faire la distinction entre les génotypes de type sauvage, hétérozygote et homozygote. L'un des ensembles de primer a été conçu pour border les points de rupture de délétion, tandis que l'autre a amplifié une région interne de la délétion. Les deux produits ont été détectés par une séparation de taille sur un gel d'agarose.

Les tests PCR ont été validés en utilisant un panel de 28 échantillons (22 échantillons pour chaque délétion) composé d'échantillons d'ADN génomique dérivés de sang et de lignée cellulaire et de plasmides synthétiques, qui englobait les génotypes TS, HET et HOM pour chaque grande délétion. Les tests PCR ont été confirmés avec une spécificité et une reproductibilité à 100 % pour tous les échantillons testés, par le biais d'une évaluation de produits PCR sur un gel d'agarose. La précision des tests PCR a été confirmée au moyen d'un séquençage Sanger et avec une valeur de 100 % pour tous les échantillons.

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

Le test de 139 variants de la fibrose kystique présentait une CP au niveau du génotype de 100 %. La CN pour toutes les positions TS était > 99,99 %, et la CG pour toutes les positions rapportées était > 99,99 %. Tous les résultats des tests sont basés sur un test initial.

Tableau 14 Précision globale du test de 139 variants de la fibrose kystique

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_2052del AAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_2176insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9.	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X(C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3 774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9.	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9.	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23§	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1§	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A [¶]	SNV	c.2490+1G>T [¶]	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P^	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0^	0	100	100	100
Y1092X (C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (Nom courant)	Type de variant	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexact	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3 885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT [€]	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	S. O.	100
I506V [¥]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	S. O.	100	100
I507V [¥]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	S. O.	100	100
F508C [¥]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	S. O.	100	100
Total			67522		557		66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV est l'acronyme pour Deletion/Insertion Variant (variant de délétion/insertion).

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

§ Un échantillon d'hétérozygote synthétique pour exon 8 a été rapporté comme hétérozygote pour le variant CFTR dele22, 23. Un examen approfondi a révélé que ce résultat provient probablement d'une faible contamination.

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

€ Avec un résultat R117H positif, le variant PolyTG/PolyT est également rapporté.

¥ Dans le cas d'un variant F508del homozygote, trois bases de type sauvage supplémentaires (c.-à-d. variants I506V, I507V, F508C) qui n'ont pas été identifiées dans l'échantillon ont également été rapportées.

¶ L'étude de validation d'origine pour le test comprenait deux échantillons synthétiques contenant le changement de nucléotide c.2490+1G>T pour le variant 2622+1G>A (les données figurent dans ce tableau). Une seconde étude de validation a ensuite été effectuée avec un échantillon synthétique contenant le changement de nucléotide c.2490+1G>A pour prendre en charge le véritable changement de nucléotide (c.2490+1G>A) associé au variant.

Tableau 15 Précision du test de 139 variants de la fibrose kystique pour I506V, I507V et F508C

Variant (nom courant)	Nombre total d'appels par variant	Appels positifs (variants)			Appels négatifs (type sauvage)	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
		Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tableau 16 Précision du test de 139 variants de la fibrose kystique pour les variants PolyTG/PolyT

Génotype PolyTGPolyT	Nombre d'échantillons cliniques	Nombre d'échantillons de lignée cellulaire	Nombre d'échantillons synthétiques	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels*	Précision en %
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100

Génotype PolyTGPolyT	Nombre d'échantillons cliniques	Nombre d'échantillons de lignée cellulaire	Nombre d'échantillons synthétiques	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels*	Précision en %
(TG)11(T)7/(TG)11 (T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total**		448		4	3	98,44

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

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

** Le nombre total d'échantillons pour le variant PolyTG/PolyT est de 448, car tous les échantillons synthétiques (n = 52) ont été conçus en mélangeant des plasmides linéarisés avec un échantillon de lignée cellulaire sur deux, qui faisaient partie de l'étude de reproductibilité. Comme le rapport du variant PolyTG/PolyT pour ces échantillons synthétiques supplémentaires entraînerait un rapport excédentaire du variant, ces échantillons synthétiques ont été exclus de cette analyse.

Reproductibilité

La reproductibilité du test de 139 variants de la fibrose kystique a été déterminée par une étude en aveugle utilisant trois sites d'essai et deux opérateurs sur chaque site. Deux panels bien caractérisés de 46 échantillons chacun ont été analysés par chacun des opérateurs sur chaque site pour un total de 810 appels par site. Les panels contenaient un mélange d'ADN génomique issu des lignées cellulaires lymphoblastiques ayant des variants connus dans le gène *CFTR*, ainsi que du sang déleucocyté enrichi de lignées cellulaires lymphoblastiques ayant des variants connus dans le gène *CFTR*. Les échantillons de sang ont été fournis pour permettre l'incorporation des étapes d'extraction utilisées dans la préparation d'ADNg qui sert d'entrée primaire pour le flux de travail du test.

Le débit de passage des échantillons, défini comme le nombre d'échantillons passant les indicateurs de contrôle qualité lors de la première tentative, était de 99,9 %.

La concordance positive au niveau du génotype pour tous les variants était de 99,77 %. La concordance négative pour toutes les positions TS était de 99,88 % et la concordance globale pour toutes les positions rapportées était de 99,88 %. Tous les résultats des tests sont basés sur un test initial. Aucun test de répétition n'a été effectué pour l'étude de reproductibilité.

Tableau 17 Reproductibilité du test de 139 variants de la fibrose kystique

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C absents	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
A	29	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	57	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	N° de l'échantillon	Génotype de l'échantillon	Variants	Nbre total d'appels par site	Appels concordants positifs (variants)			Appels concordants négatifs (de type sauvage)			Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)
					Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3					
B	72 [§]	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75^	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135^	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 [§]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 [§]	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	TS		810	0	0	0	810	810	810	0	0	S. O.	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2 209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

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

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

** Des preuves indiquent que les échantillons 9 et 10 ont été vraisemblablement échangés par l'opérateur avant la préparation de la librairie.

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

Tableau 18 Renseignements supplémentaires sur les variants de l'étude de reproductibilité

Variation (nom courant)	Type de variant	Région du gène CFTR
PolyTG/PolyT	Composé DIV*	Intron 9
2183AA>G	Composé DIV*	Exon 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1-Intron3
1154insTC	DIV*	Exon 8
I507del	DIV*	Exon 11
F508del	DIV*	Exon 11
2143delT	DIV*	Exon 14
3659delC	DIV*	Exon 22
3876delA	DIV*	Exon 23
394delTT	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 3
1078delT	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 8
2184delA	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 14
3905insT	DIV dans la région homopolymérique*	Exon 23
E60X	SNV	Exon 3
R75X	SNV	Exon 3
G85E	SNV	Exon 3
E92X	SNV	Exon 4
R117H	SNV	Exon 4
Y122X	SNV	Exon 4
621+1G>T	SNV	Intron 4
G178R	SNV	Exon 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Exon 6
G330X	SNV	Exon 8
R334W	SNV	Exon 8
I336K	SNV	Exon 8
R347P	SNV	Exon 8
R347H	SNV	Exon 8
A455E	SNV	Exon 10
Q493X	SNV	Exon 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Exon 12
S549N	SNV	Exon 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Exon 12
G551D	SNV	Exon 12
R553X	SNV	Exon 12
R560T	SNV	Exon 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12

Variation (nom courant)	Type de variant	Région du gène CFTR
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Exon 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X(C>A)	SNV	Exon 20
M1101K	SNV	Exon 20
R1158X	SNV	Exon 22
R1162X	SNV	Exon 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Exon 23
N1303K	SNV	Exon 24

* DIV est l'acronyme pour Deletion/Insertion Variant (variant de délétion/insertion).

Extraction d'ADN

Trois méthodes d'extraction disponibles dans le commerce et couramment utilisées correspondant à l'extraction à base de billes magnétiques, la précipitation alcoolique et la filtration sur colonne de silice ont été évaluées à l'aide du sang total anticoagulé EDTA. Au total, 14 échantillons de sang uniques ont été utilisés dans l'étude, correspondant au génotype de type sauvage et aux trois génotypes mutants (trois échantillons avec F508del, un échantillon avec I506V et un échantillon avec D110H). Les trois méthodes d'extraction d'ADN ont été testées indépendamment par deux opérateurs différents, qui ont effectué trois analyses par méthode d'extraction. Chaque extraction a été réalisée par chaque opérateur à des jours différents. La concentration d'ADN et le rapport A260/A280 des échantillons d'ADNg extrait ont été déterminés par spectrophotométrie. La taille totale des échantillons pour chaque méthode d'extraction dans cette étude était de 168 (14 échantillons × 2 opérateurs/méthode d'extraction × 3 analyses/opérateur × 2 réplicats/échantillon d'ADNg extrait).

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

* Pourcentage d'échantillons présentant un débit d'appel ≥ 99 % dans la première analyse.

Entrée d'ADN

La plage d'entrée d'ADN du test de 139 variants de la fibrose kystique a été évaluée en effectuant une étude de dilution en série au moyen de 14 échantillons d'ADN représentatifs contenant 16 variants de fibrose kystique uniques. Chaque échantillon a été testé en double exemplaire sur 9 niveaux d'entrée d'ADN allant de 1 250 à 1 ng (1 250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng et 1 ng). Pour la détermination de la précision, des génotypes d'échantillon ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel Sanger et les délétions ont été comparées à un test PCR. Les limites supérieure et inférieure identifiées pour une entrée d'ADN sont respectivement de 1 250 ng et 25 ng, car elles présentaient un débit au premier passage ≥ 95 % sans aucun appel incorrect (précision et débit d'appel de 100 %).

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

Les résultats indiquent que le test à 139 variants de la fibrose kystique peut être utilisé dans la plage d'entrées d'ADN variant de 1 250 à 25 ng pour produire des résultats précis.

Substances interférentes

Pour évaluer l'incidence de substances interférentes sur le test de 139 variants de la fibrose kystique, les performances du test ont été évaluées en présence et en l'absence d'éventuels éléments interférents. Huit spécimens de sang total ont été testés dans l'étude, notamment trois échantillons positifs à la fibrose kystique avec des génotypes uniques. Quatre substances interférentes endogènes (bilirubine, cholestérol, hémoglobine et triglycéride) ont été testées en les intégrant à des spécimens de sang avant l'extraction d'ADN. Les limites de concentration pour chaque substance sont indiquées dans le tableau ci-dessous. En outre, pour évaluer l'interférence résultant du prélèvement sanguin (petit volume), de l'EDTA a été intégré aux échantillons de sang. Pour évaluer l'interférence résultant de la préparation d'échantillon, le tampon de lavage final d'une méthode de filtration sur colonne de silice a été ajouté à de l'ADN génomique purifié.

Le test de 139 variants de la fibrose kystique a atteint un débit d'appel de 100 % pour tous les échantillons testés, et un taux de reproductibilité de 100 % de typages génotypiques entre les échantillons en présence et en l'absence de substances interférentes.

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

Aucune interférence n'a été observée au niveau de tous les éléments interférents endogènes ou exogènes.

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

Indexage de l'échantillon

Des primers d'indexage de l'échantillon ont été utilisés pour attribuer un code à barres unique à chaque échantillon d'ADN, permettant la capacité de grouper plusieurs échantillons en une seule analyse de séquençage. Au total, 96 index d'échantillons ont été analysés à l'aide de huit échantillons d'ADN unique pour vérifier la capacité du test à faire systématiquement un génotypage pour un échantillon donné à travers des combinaisons différentes de primers d'indexage. Chaque échantillon a été analysé avec 12 combinaisons différentes de primers d'indexage. Les résultats des échantillons ont été comparés aux données de séquençage bidirectionnel Sanger pour l'ensemble des positions/variants, excepté les deux grandes délétions qui ont été confirmées à l'aide du test duplex PCR. La reproductibilité et la précision ont été de 100 % pour toutes les combinaisons de primers d'indexage/échantillon.

Équivalence de performance avec le test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina

Le test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight (TruSight CF139) utilise le même flux de préparation des bibliothèques et les mêmes réactifs que le test de dépistage de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina (MiSeqDx CF139). Le TruSight CF139 utilise la trousse de réactifs MiSeqDx v3 tandis que le MiSeqDx CF139 utilise les réactifs de séquençage inclus avec le test. Pour démontrer l'équivalence entre le TruSight CF139 et le MiSeqDx CF139, les résultats de neuf analyses du TruSight CF139 ont été comparés à une seule analyse du MiSeqDx CF139 comme norme de référence. Les tests TruSight CF139 ont été effectués avec un débit de 96 échantillons (débit maximal pour le TruSight CF139) et le MiSeqDx CF139 avec un débit de 48 échantillons (débit maximal pour le MiSeqDx CF139). Les sources de variabilité incluses dans les analyses du TruSight CF139 comprenaient trois événements de préparation des bibliothèques (chacun avec un lot unique de TruSight Cystic Fibrosis), trois opérateurs, trois instruments MiSeqDx et trois lots de trousse de réactifs MiSeqDx v3.

Les appels de variants des analyses TruSight CF139 ont été comparés aux appels effectués par l'analyse MiSeqDx CF139. 47 échantillons uniques ont été inclus dans chaque analyse TruSight CF139, avec 2 ou 3 répétitions par échantillon (95 échantillons d'ADN et 1 NTC par analyse). Pour l'analyse MiSeqDx CF139, les mêmes 47 échantillons ont été séquencés en tant que singleton (47 échantillons d'ADN + 1 NTC par analyse). Le panneau des échantillons était composé d'échantillons d'ADN de Coriell extraits de lignées cellulaires immortalisées et comprenait des échantillons représentant chaque allèle des mutations ACMG 23, des variants de délétion-insertion (y compris l'insertion/délétion dans des régions homopolymères et l'insertion avec délétion dans la même région), des variants homozygotes, des variants hétérozygotes composées, une des grandes délétions ciblées, un variant PolyTG/PolyT commun, de nombreux variants à nucléotide unique et un échantillon sans variants détectés. Un résumé des résultats par génotype est fourni dans le [Tableau 19](#). La concordance entre les essais par type de variant est présentée dans le [Tableau 20](#). La concordance globale (totale) entre les analyses était > 99,99 %.

Tableau 19 Comparaison des performances du test TruSight de 139 variants de la fibrose kystique avec celles du test MiSeqDx de 139 variants de la fibrose kystique

		Test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx				
		Variant HOM	Variant HET	Type sauvage	Absence d'appel	Total
Test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight	Variant HOM	87	-	-	-	87
	Variant HET	-	1 098	-	-	1 098
	Type sauvage	-	-	113 889	-	113 889
	Absence d'appel	-	-	-	-	-
	Total	87	1 098	113 889	-	115 074

Tableau 20 Performance par type de variant du test TruSight de 139 variants de la fibrose kystique comparée à celle du test MiSeqDx de 139 variants de la fibrose kystique

Type de variant	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appels	Concordance avec le test MiSeqDx de 139 variants de la fibrose kystique
SNV	672	0	0	100,00 % (672/672)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	495	0	0	100,00 % (495/495)
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44 % (17/18)

Type de variant	Appels exacts	Appels inexact	Absence d'appels	Concordance avec le test MiSeqDx de 139 variants de la fibrose kystique
Aucun (type sauvage)	113 889	0	0	100,00 % (113 889/113 889)
Total	115 091	1	0	> 99,99 % (115 091/115 092)

Un seul appel discordant a été observé entre le test TruSight CF139 et le test MiSeqDx CF139. L'appel inexact spécifique était un variant de PolyTG/PolyT. Un résumé de la concordance PolyTG/PolyT est fourni dans le [Tableau 21](#). Comme le génotype PolyTG/PolyT n'est signalé que si le variant R117H est également détecté, l'ensemble de données ne comprend que les appels PolyTG/PolyT provenant d'une seule source d'ADN.

Tableau 21 Comparaison des performances d'appel de variants PolyTG/PolyT du test TruSight de 139 variants de la fibrose kystique avec celles du test MiSeqDx de 139 variants de la fibrose kystique

		Test de 139 variants de la fibrose kystique MiSeqDx			
		(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	Absence d'appel	Total
Test de 139 variants de la fibrose kystique TruSight	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	-	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	-	-	1
	Absence d'appel	-	-	-	-
	Total	18	-	-	18

Caractéristiques de performance du test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Les caractéristiques de performance du test de séquençage clinique de la fibrose kystique se basent sur les études qui ont utilisé le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx. L'équivalence entre les essais de TruSight et MiSeqDx est fourni dans la section [Équivalence de performance avec le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina](#), page 90.

Précision

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

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

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

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

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

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

Tableau 22 Précision globale pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
D110H	c.328G>C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
E279D	c.837A>T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100
W401X(c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
W401X(c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	S. O.	PolyTG PolyT	Intron9	369	79	52	3	4 [#]	98,60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
A455E	c.1364C>A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T > G)	c.1647T>G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
E585X	c.1753G>T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron16	9.	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0 ^Y	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exon22	9.	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exon23	9.	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exon24	9.	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100

Génotype (nom courant/nom d'ADNc/coordonnée)	cDNA Name (Nom de l'ADNc)	Type de variant	Région du gène CFTR (hg19)	Appels positifs (variants)			Aucun appel*	Appels incorrects	Concordance positive
				Échantillons cliniques	Échantillons de lignée cellulaire	Échantillons synthétiques			
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
Total tous variants (CP)†					2072		3	4	99,66
Total tous TS (CN)					2600928		1	2 [§]	> 99,99
Total tous TS et variants (CG)					2603000		4	6	> 99,99

DIV est l'acronyme pour Deletion/Insertion Variant (variant de délétion/insertion).

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

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

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

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

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

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

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

Tableau 23 Précision des variants PolyTG/PolyT pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Génotype PolyTGPolyT	Nombre d'échantillons cliniques	Nombre d'échantillons de lignée cellulaire	Nombre d'échantillons synthétiques	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels*	Précision en %
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100

Génotype PolyTGPolyT	Nombre d'échantillons cliniques	Nombre d'échantillons de lignée cellulaire	Nombre d'échantillons synthétiques	Nbre d'appels inexacts	Nbre d'absences d'appels*	Précision en %
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Total		448		4	3	98,44

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

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

Reproductibilité

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

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

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

Tableau 24 Reproductibilité du test de séquençage clinique de la fibrose kystique (excluant les variants PolyTG/PolyT)

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

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9.	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9.	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9.	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9.	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
9.	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X(C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97.22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97.22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97.22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100

Échantillon	Nom du HGVS (ou emplacement si aucun HGVS)	Nom du variant	Total résultats		Appels concordants			Total* (tous les sites)		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Aucun appel [€]	Appels incorrects	
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Total tous variants (CP)** (incluant les données PolyTG/PolyT dans le Tableau 25)			2 580	7 740	2 562	2 553	2 565	37	23	99,22
Total tous TS (CN)			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Total tous TS et variants (CG)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

[€] Les échantillons n'ont pas été ré-analysés.

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

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

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

Tableau 25 Reproductibilité des variants PolyTG/PolyT pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Absence d'appels	Appels incorrects	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Absence d'appels	Appels incorrects	
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	9.	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22 %
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78 %
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Absence d'appels	Appels incorrects	
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44 %
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Panel	Échantillon	Génotype	Nombre de résultats		Appels concordants			Total tous sites		% de concordance
			Par site	Tous les sites	Site 1	Site 2	Site 3	Absence d'appels	Appels incorrects	
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89 %
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0 %
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
Total des variants PolyTG/PolyT (CP)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83 %

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

Extraction d'ADN

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

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

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

Entrée d'ADN

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

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

Substances interférentes

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

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

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

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

Équivalence de performance avec le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique TruSight (TruSight CFCS) utilise le même flux de préparation des bibliothèques et les mêmes réactifs que le test de la fibrose kystique MiSeqDx Illumina (MiSeqDx CFCS). Le TruSight CFCS utilise la trousse de réactifs MiSeqDx v3 tandis que le MiSeqDx CFCS utilise les réactifs de séquençage inclus avec le test. Pour démontrer l'équivalence entre le TruSight CFCS et le MiSeqDx CFCS, les résultats de neuf analyses du TruSight CFCS ont été comparés à une seule analyse du MiSeqDx CFCS comme norme de référence. Les tests TruSight CFCS ont été effectués avec un débit de 96 échantillons (débit maximal pour le TruSight CFCS) et le MiSeqDx CFCS avec un débit de 48 échantillons (débit maximal pour le MiSeqDx CFCS). Les sources de variabilité incluses dans les analyses du TruSight CFCS comprenaient trois événements de préparation des bibliothèques (chacun avec un lot unique de TruSight Cystic Fibrosis), trois opérateurs, trois instruments MiSeqDx, et trois lots de trousse de réactifs MiSeqDx v3.

Les appels de variants des analyses TruSight CFCS ont été comparés aux appels effectués par l'analyse MiSeqDx CFCS. 47 échantillons uniques ont été inclus dans chaque analyse TruSight CFCS, avec 2 ou 3 répétitions par échantillon (95 échantillons d'ADN et 1 NTC par analyse). Pour l'analyse MiSeqDx CFCS, les mêmes 47 échantillons ont été séquencés en tant que singleton (47 échantillons d'ADN + 1 NTC par analyse). Le panneau des échantillons était composé d'échantillons d'ADN de Coriell extraits de lignées cellulaires immortalisées et comprenait des échantillons représentant chaque allèle des mutations ACMG 23, des variants de délétion-insertion (y compris l'insertion/délétion dans des régions homopolymères et l'insertion avec délétion dans la même région), des variants homozygotes, des variants hétérozygotes composées, une des grandes délétions ciblées, des variants PolyTG/PolyT, des variants à nucléotide unique et un échantillon sans variants détectés. Un résumé des résultats par génotype est fourni dans le [Tableau 26](#). La concordance entre les essais par type de variant est présentée dans le [Tableau 27](#). La concordance globale (totale) entre les analyses était > 99,99 %.

Tableau 26 Comparaison des performances du test TruSight CFCS avec celles du test MiSeqDx CFCS

		Test clinique de la FK MiSeqDx				
		Variant HOM	Variant HET	Type sauvage	Absence d'appel	Total
Test clinique FK TruSight	Variant HOM	551	-	-	-	551
	Variant HET	-	2 664	-	-	2 664
	Type sauvage	-	-	4 426 182	-	4 426 182
	Absence d'appel	-	-	58	-	58
	Total	551	2 664	4 426 420	-	4 429 455

Tableau 27 Performance par type de variants du test de séquençage clinique de la fibrose kystique TruSight comparée à celle du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

Type de variant	Appels exacts	Appels inexacts	Absence d'appels	Concordance avec le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx
SNV	2 684	0	0	100,00 % (2 684/2 684)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	513	0	0	100 00 % (513/513)
PolyTG/PolyT	847	1	3	99,88 % (847/851)
Aucun (type sauvage)	4 426 182	0	58	100,00 % (4 426 182/4 426 240)
Total	4 430 244	1	61	> 99,99 % (4 430 244/4 430 306)

Un seul appel discordant a été observé entre le test TruSight CFCS et le test MiSeqDx CFCS. L'appel inexact spécifique était un variant de PolyTG/PolyT. Un résumé de la concordance PolyTG/PolyT est fourni dans le [Tableau 28 page 92](#).

Tableau 28 Comparaison des performances d'appel de variants PolyTG/PolyT du test de séquençage clinique de la fibrose kystique TruSight avec celles du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

		Tableau du test clinique de la FK MiSeqDx													
		(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)5	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)10 (T)9/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)11 (T)7/ (TG)11 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)12 (T)5/ (TG)12 (T)5	Absence d'appel	Total	
Test clinique FK TruSight	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	
	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)9	-	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189	
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	18	
	(TG)10(T)9/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	72	
	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17	
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)7	-	-	-	-	-	-	126	-	-	-	-	-	126	
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	-	-	-	249	-	-	-	-	249	
	(TG)11(T)7/ (TG)11(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	72	-	-	-	72	
	(TG)11(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	36	
	(TG)12(T)5/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
Absence d'appel	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3		
Total		50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-	851	

Références

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Comité sur la génétique. (Avril 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12) : 851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Steman DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA) : University of Washington; 2008. Disponible sur www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [En ligne] Mise à jour le 19 février 2008.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponible sur www.uptodate.com. [En ligne] 7 décembre 2012.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2) : S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponible sur www.genet.sickkids.on.ca/app. [En ligne] Août 2013.
- 10 Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6) : 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponible sur www.cftr2.org. [En ligne] Août 2013.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponible sur www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [En ligne] Présenté par Garry Cutting au nom du projet CFTR2 lors de la 25e Conférence Nord-américaine sur la fibrose kystique (NACFC) parrainée par la Fondation de la fibrose kystique. 4 novembre 2011. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10) : 1160–1167
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (Mars/avril 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7 : 179–196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (mai 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (édition de 2008, révisée de 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

Brevets et marques de commerce

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

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

Coordonnées



Illumina

5200 Illumina Way

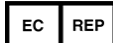
San Diego, Californie 92122 États-Unis

+(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 voir la liste complète des symboles qui peuvent figurer sur l'emballage et l'étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles de votre trousse sur le site support.illumina.com.