

INSTRUCTIONS D'UTILISATION

16, 32, 48 ET 96 ECHANTILLONS

SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution



Réservé à l'usage diagnostique in vitro (IVD)
Non destiné au dépistage par autotest





INFORMATIONS RESUMEES

Nom du produit	SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution
Type de produit	Solution tout-en-un
Famille de produits	Application diagnostic moléculaire (kit + analyse)
ID de l'algorithme	ILL1XG1S9_CNV
ID du panel génétique	MYS_v1
Version du produit	1.0
Type d'échantillon	ADN somatique isolé dans le sang
Séquenceur	Illumina - MiSeq
Description de la nomenclature mondiale des dispositifs médicaux (GMDN)	Kit de réactifs pour DIV / logiciel pour interprétation d'analyse génomique humaine
ID du document	SG-00681
Version du document	v6.0
Date de révision	Janvier 2026

Ce mode d'emploi s'applique à toutes les versions de SOPHiA DDM™ Dx.
Veuillez lire attentivement la totalité du mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0103ILLCSML01-016
BS0103ILLCSML01-032
BS0103ILLCSML01-048
BS0103ILLCSML01-96



SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d'Elhuyar
F-64210 Bidart, France





CODES PRODUITS

	CODE PRODUIT COMPLET	BOX 1	BOX 2	KIT DE PRÉPARATION DE BIBLIOTHÈQUE
REF	BS0103ILLCSML01-016	B1.01.0003.C-16	B2.0003.C-16	700232
	BS0103ILLCSML01-032	B1.01.0003.C-32	B2.0003.C-32	700232
	BS0103ILLCSML01-048	B1.01.0003.C-48	B2.0003.C-48	700234
	BS0103ILLCSML01-96	B1.01.0003.C-96	B2.0003.C-48	700234



AVIS DE NON-RESPONSABILITE

Ce document et son contenu sont la propriété de SOPHiA GENETICS SA et de ses sociétés affiliées (« SOPHiA GENETICS ») et doivent uniquement être utilisés à des fins contractuelles par ses clients, conformément à l'utilisation du ou des produits décrits ci-après et à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne doivent être utilisés ou distribués à aucune autre fin et/ou communiqués, divulgués, reproduits ou référencés de quelque façon que ce soit sans le consentement écrit préalable de SOPHiA GENETICS.

SOPHiA GENETICS ne transmettra, par le présent document, aucune licence en vertu de tout brevet, de toute marque, de tout droit d'auteur ou de tout droit commun, ni de tout droit similaire, de quelque partie tierce. Les instructions figurant dans le présent document doivent être strictement et explicitement suivies par un personnel qualifié et parfaitement formé afin de garantir l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits ci-après. L'ensemble du contenu de ce document doit être lu et compris dans son intégralité, préalablement à l'utilisation dudit ou desdits produits.

VEUILLEZ LIRE L'INTÉGRALITÉ ET SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES CI-APRÈS, AU RISQUE D'ENDOMMAGER LE(S) PRODUIT(S), DE BLESSER DES PERSONNES, NOTAMMENT LES UTILISATEURS OU D'AUTRES PERSONNES, ET D'ENTRAÎNER DES DOMMAGES MATÉRIELS.

SOPHiA GENETICS N'ASSUME AUCUNE RESPONSABILITÉ LIÉE À UNE MAUVAISE UTILISATION DU OU DES PRODUITS DÉCRITS CI-APRÈS (Y COMPRIS DES PIÈCES DE CEUX-CI OU LEUR LOGICIEL).

NOMS DE MARQUE

Illumina® et MiSeq® sont des noms de marques déposés d'Illumina, Inc.

AMPure® et Agencourt® sont des noms de marques déposés de Beckman Coulter, Inc.

Qubit® et Dynabeads® sont des noms de marque déposés de Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ est un nom de marque de Roche.

QIAseq® est un nom de marque déposé de Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ et SOPHiA DDM™ Dx sont des noms de marques de SOPHiA GENETICS SA et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Tous les autres noms, logos et noms de marque appartiennent à leurs propriétaires respectifs. SAUF PRÉCISION SPÉCIFIQUE, L'UTILISATION PAR SOPHiA GENETICS DE NOMS DE MARQUE DE TIERS N'INDIQUE AUCUNE RELATION, AUCUN SPONSORING NI AUCUNE VALIDATION ENTRE SOPHiA GENETICS ET LES PROPRIÉTAIRES DE CES NOMS DE MARQUE. Toute référence faite par SOPHiA GENETICS à des noms de marques de tiers vise à identifier les produits et/ou services du tiers concerné et est considérée comme un usage loyal nominatif en vertu du droit des marques.



HISTORIQUE DES REVISIONS

ID DU DOCUMENT/ VERSION	DATE	Version équivalente en anglais des instructions d'utilisation	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
SG-00681 – 6.0	Janvier 27 2026	SG-00659 – 8.0	• Changement du système de numérotation des versions, aucune version supplémentaire entre 5.4 et 6.0. • Ajout d'une nouvelle colonne dans le tableau de l'historique des révisions afin de suivre la version anglaise correspondante ; la colonne est vide pour toutes les revisions précédentes. • Section 2 : Retrait des indications de maladie ; mise à jour du nom du composant de préparation de bibliothèque. • Section 3 : Retrait des composants non concernés et de la SOPHiA DDM Desktop App de la description. • Avertissements et précautions : Ajout du numéro CAS et de la concentration de chaque composant dangereux listé. • Retrait des limitations hors champ d'application. • Retrait des instructions hors champ d'application de la section « Composants des produits ». • Retrait de la section « Résumé et explication du test ». • « Application Web SOPHiA DDM™ » devient « SOPHiA DDM™ Dx mode ». • Légères reformulations en lien avec la modification ci-dessus. • Réduction du volume du contenu des sondes d'hybridation SOPHiA GENETICS de 20 µl à 18 µl (voir section 5.1.1 « Contenu du kit - BOX 1 »). • Retrait de la propriété intellectuelle des fournisseurs tiers dans les sections 5.1.1 « Contenu du kit », 5.3.1 « Regroupement de bibliothèques » et 5.3.2 « Hybridation ».
SG-00681– 5.4	23 mai 2025		• Annexe 1 : Le tableau « 16 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune) » a été supprimé de l'Annexe 1 en raison de l'abandon du format de plaque contenant 16 adaptateurs à index double. • Section 5.1.1 Contenu du kit – BOÎTE 1 : Mise à jour pour refléter le changement ci-dessus.
SG-00659 – 5.3	19 mars 2025		• Section 5.1.1. Contenu du kit - BOÎTE 1: Augmentation du volume du tampon d'hybridation 2x de 50 µl à 75 µl ; Augmentation du volume de l'Amplificateur pour tampon d'hybridation de 20 µl à 30 µl.



ID DU DOCUMENT/ VERSION	DATE	Version équivalente en anglais des instructions d'utilisation	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
SG-00659 – 5.2	22 novembre 2024		Mise à jour de l'adresse du REP CE
SG-00659 – 5.1	1 septembre 2023		Correction d'erreurs de mise en forme
SG-00659 – 5.0	14 septembre 2022		- Ajouts des symboles de marque de SOPHiA DDM et SOPHiA GENETICS. - Remplacement du nom du kit de préparation de bibliothèque par SOPHiA GENETICS™ Dx dans l'ensemble du document - Mise à niveau de la version du document sur le nombre entier suivant, sans décimale.
SG-00659 – 4.5	19 avril 2022		Ajout des instructions pour l'application Web SOPHiA DDM™
SG-00158 - 4.4	14 avril 2022		- Limites et avertissements : Modifié - Mise à jour de l'adresse des bureaux SOPHiA GENETICS - Modifications Wet Lab comme recommandé globalement - Modifications mineures et correction d'erreurs typographiques
ID-60101-17 - 4.3	21 juillet 2021		- Page 2 - ID du document corrigé. - Page 2, 29 - Modifications esthétiques. - Page 17 - Modification de l'ordre des étapes. - Page 26 - Volume de pré-mélange pour PCR « 48 échantillons » corrigé.
ID-60101-17 - 4.2	16 juin 2021		- Page 3 - Nom de marque modifié. - Page 44 - Ajout mineur aux spécifications de fichier. - Page 55, 56 - Erreur dans l'en-tête « Unique » supprimée.
ID-60101-17 - 4.1	28 mai 2021		- Page 2 - Tableau informations résumées modifiées. - Page 3 - Avis de non-responsabilité modifié - Page 11, 13, 15, 29 - En-tête de tableau modifié. - Page 16 - Inversion de l'ordre des étapes 1 et 2. - Page 17 - Préparation d'éthanol déplacée vers 'Préparation'. - Page 12, 18, 19, 21, 22, 23, 27, 35, 36, 37, 38, 43 - Changements esthétiques et erreurs typographiques. - Page 20 - Point 1, puce 2 - remplacement de « FX Enhancer (FX Amplificateur) » par « FX Reaction pre-mix (FX Pré-mélange réactionnel). - Page 47 - Ajout des puces 2 et 18, modification du point 19.



ID DU DOCUMENT/ VERSION	DATE	Version équivalente en anglais des instructions d'utilisation	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
ID-60101-17 - 4.0	30 mars 2021		• Page de titre, logo de l'entreprise, en-tête, pied de page, dernière page. • Réorganisation des thèmes • Inclusion des instructions pour l'installation de l'application Web de SOPHiA DDM™, le chargement et les conventions pour les noms. • Combinaison du « Mode d'emploi » de quatre tailles de kit pour inclure des nombres d'échantillons différents. Ajout des tableaux et modifications appropriées à cette fin si nécessaires. • Les documents suivants « Mode d'emploi » des kits ont été combinés : - PM_CEIVD_B2.1.1.14_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.16_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.18_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.24_r1en • Modifications mineures à des fins de clarté dans les sections suivantes : • Section 5.3.1 Regroupement de bibliothèques • Section 5.3.5 Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié



TABLE DES MATIERES

1. Utilisation prévue/Finalité.....	10
2. Déclaration générale du ou des principes/de la procédure de test.....	11
3. Composants du produit.....	12
4. Consommables du kit et méthodes.....	13
4.1. Considérations initiales	13
4.1.1. Contenu du kit (16, 32, 48 et 96 échantillons).....	13
4.1.2. Avertissements et précautions	15
4.1.3. Matériel requis (non fourni)	17
4.2. Préparation de bibliothèque	18
4.2.1. Préparation de l'ADN génomique	18
4.2.2. Préparation de pré-mélanges et de réactifs	19
4.2.3. Fragmentation enzymatique, réparation d'extrémité et poly-adénylation	21
4.2.4. Ligature.....	23
4.2.5. Nettoyage après ligature.....	24
4.2.6. Sélection de taille double.....	25
4.2.7. Amplification de bibliothèque.....	26
4.2.8. Nettoyage après amplification	27
4.2.9. Quantification et contrôle qualité individuels de la bibliothèque	28
4.3. Capture	29
4.3.1. Regroupement de bibliothèques	29
4.3.2. Hybridation.....	30
4.3.3. Préparation des billes de streptavidine	33
4.3.4. Liaison de cibles hybridées aux billes	34
4.3.5. Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié	34
4.3.6. Amplification post-capture.....	36
4.3.7. Nettoyage de l'amplification post-capture	37
4.3.8. Quantification et contrôle qualité finals de la bibliothèque	39
4.4. Séquençage.....	40
4.4.1. Préparation de bibliothèque pour le séquençage.....	40
5. Procédure d'analyse	41
5.1. Instructions d'installation du SOPHiA DDM™ Dx Mode	41
5.2. Description du workflow d'analyses pour la génération de résultats de diagnostics in vitro (IVD)	41
6. Limitations, avertissements et précautions.....	42
7. Évaluation des performances non cliniques.....	45
7.1. MÉTHODES	45
7.2. DONNÉES.....	47
7.3. CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	47
7.4. RÉSULTATS.....	49



8. Symboles	50
9. Assistance	51
Annexe 1. Plaques pour adaptateurs à index double	52
Annexe 2. Matériel de laboratoire utilisé dans le laboratoire de SOPHiA GENETICS.....	55
Annexe 3. Workflow général – SOPHiA DDM™ Capture Solutions (SOPHiA DDM™ Solutions de capture).....	58
Annexe 4. Liste des régions cibles et des régions signalées applicables.....	60



1. UTILISATION PREVUE/FINALITE

Le produit doit servir à identifier l'apparition de variants dans 30 gènes impliqués dans des néoplasmes myéloïdes en ciblant des positions spécifiques sujettes à la mutation dans la séquence génomique. Le produit permet aux professionnels de santé de prendre une décision clinique concernant des néoplasmes myéloïdes et de fournir une explication moléculaire pour un traitement adapté.

Le produit doit être utilisé dans le cadre d'un diagnostic in vitro et uniquement par des professionnels.



2. DECLARATION GENERALE DU OU DES PRINCIPES/DE LA PROCEDURE DE TEST

La fonction validée de l'analyse de SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) est d'analyser des données NGS brutes générées par un appareil Illumina MiSeq® avec MiSeq® Reagent Kit v3, sur des échantillons somatiques isolés du sang avec KAPA® Library Amplification Kit et SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

La méthode SOPHiA DDM™ Dx MYS se compose de trois étapes principales. La première étape consiste à qualifier l'échantillon d'ADN sanguin pouvant être utilisé pour le test. La seconde étape consiste à préparer manuellement les échantillons pour le séquençage (préparation de la bibliothèque). La préparation de la bibliothèque se compose de sept étapes clés : Fragmentation de l'ADN, ligature des adaptateurs, amplification PCR des bibliothèques individuelles, regroupement de bibliothèques, hybridation des sondes, amplification par PCR lors de la capture et post-capture. La troisième procédure consiste à séquencer l'échantillon préparé en utilisant la chimie SBS (« Sequencing By Synthesis » ou séquençage par synthèse) sur le séquenceur Illumina MiSeq®.

Pour l'analyse, les résultats doivent être téléchargés sur la plateforme SOPHiA DDM™ et analysés en utilisant l'application SOPHiA DDM™ Dx MYS.

Tableau 1 : Liste des gènes ciblés par le produit

ABL1	FLT3	PTPN11
ASXL1	HRAS	RUNX1
BRAF	IDH1	SETBP1
CALR	IDH2	SF3B1
CBL	JAK2	SRSF2
CEBPa	KIT	TET2
CSF3R	KRAS	TP53
DNMT3A	MPL	U2AF1
ETV6	NPM1	WT1
EZH2	NRAS	ZRSR2



3. COMPOSANTS DU PRODUIT

SOPHiA DDM™ Dx MYS est composé de deux éléments : le kit NGS et le pipeline de bio-informatique utilisés en combinaison avec un accessoire d'IVD, le SOPHiA DDM™ Dx mode basé sur le cloud.

- Le kit NGS consiste à préparer et à enrichir des bibliothèques d'ADN à partir d'échantillons sanguins adaptés au séquençage sur un séquenceur Illumina® MiSeq®. Le kit NGS permet aux utilisateurs de générer des données de séquençage ciblées. Les différents éléments sont décrits dans les sections suivantes 5. Consommables du kit et méthodes – 5.1. Considérations initiales - 5.1.1 Contenu du kit.
- Le pipeline de bio-informatique (« pipeline MYS ») traite les données NGS brutes via des algorithmes capables d'évaluer l'intégrité génomique.
- SOPHiA DDM™ Dx mode est une application Web front-end disponible en tant que SaaS (Software-as-a-Service) et permettant de générer un rapport téléchargeable des gènes mentionnés dans le Tableau 1 pour les SNV et INDEL. Des limitations s'appliquant, consultez la section 7 - Limitations, avertissements et précautions.



4. CONSOMMABLES DU KIT ET METHODES

4.1. Considérations initiales

Assurez-vous que tous les tubes du kit sont physiquement intacts et stockés conformément aux températures recommandées, dès leur réception, pour garantir des performances optimales. Une manipulation et un stockage inappropriés des composants du kit dans des conditions autres risque de nuire à ses performances.

4.1.1. Contenu du kit (16, 32, 48 et 96 échantillons)

Veillez à toujours centrifuger brièvement les tubes avant de les utiliser pour recueillir tout le liquide.

Selon le format du kit, les composants suivants seront fournis :

COMPOSANT	NOMBRE D'ÉLÉMENTS, SELON LE FORMAT DU KIT			
	Kit de 16 échantillons	Kit de 32 échantillons	Kit de 48 échantillons	Kit de 96 échantillons
BOX 1	1	1	1	2 (48 échantillons chacun)
Adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® (dans une plaque à 96 puits incluse dans la boîte 1)	32	32	48	96 (Plaque figurant dans l'une des deux boîtes 1)
BOX 2	1	1	1	2 (48 échantillons chacun)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (16 échantillons chacun)	1	2 (48 échantillons chacun)

BOX 1 (STOCKER À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE -25 °C ET -15 °C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Myeloid Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2X Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10X Stringent Wash Buffer (200 µl)



- 10X Wash Buffer I (160 µl)
- 10X Wash Buffer II (110 µl)
- 10X Wash Buffer III (110 µl)
- Selon le format du kit : 32, 48, 48 ou 96 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® dans une plaque à 96 puits (7 µl chacun) : voir Annexe 1 pour l'affichage et les séquences d'adaptateurs.

BOX 2 (STOCKER À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE +2 °C ET +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml pour 16 échantillons, 8,7 ml pour 32 échantillons et 11,6 ml pour 48 échantillons, lire la Remarque pour 96 échantillons)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Remarque : Pour 96 échantillons, deux boîtes 2 de 48 échantillons sont fournies (voir le tableau de la page précédente).



Important : Pour en savoir plus, consultez les avertissements et précautions ci-dessous.

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I (STOCKEZ À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE -25 °C ET -15 °C)

- Pour 32 échantillons, deux kits de 16 échantillons sont fournis.
- Pour 96 échantillons, deux kits de 48 échantillons sont fournis.

COMPOSANTS	FORMAT DU KIT	
	Kit de 16 échantillons	Kit de 48 échantillons
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	500	1 560
Mélange d'amorces pour amplification de bibliothèque Illumina® (en µl)	30	95
FX Mélange enzymatique (en µl)	200	625
10 FX tampons (en µl)	100	315
FX Amplificateur (en µl)	100	315
ADN ligase (en µl)	200	625
5 tampons d'ADN ligase (en µl)	400	1 250



Important : Pour en savoir plus, consultez les avertissements et précautions ci-dessous.



4.1.2. Avertissements et précautions

PICTOGRA				
Nom du produit	MME SGH	Mentions de dangers et conseils de prudence	Mot indicateur	Composant dangereux
2x Tampon d'hybridation	 	• H300 Mortel en cas d'ingestion. • H311 Toxique par contact cutané. • H315 Cause une irritation cutanée. • H370 Cause des dommages aux organes. • H370 Cause des dommages aux organes (système nerveux central). • H411 Toxique pour les organismes aquatiques, avec des effets durables à long terme. • P260 Ne pas respirer les vapeurs/vaporiser. • P264 Laver soigneusement la peau contaminée après manipulation. • P270 Ne pas ingérer, boire ou fumer durant l'utilisation de ce produit. • P273 Éviter de déverser dans l'environnement. • P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et du visage. • P301+P310 En cas d'ingestion : Appeler immédiatement un centre anti-poison/médecin. • P302+P352 En cas de contact avec la peau : Laver abondamment à l'eau. • P308+P311 En cas d'exposition ou d'inquiétude : Appeler un centre anti-poison ou un médecin. • P321 Traitement spécifique (lire les conseils médicaux sur cette étiquette). • P330 Rincer la bouche. • P332+P313 En cas d'irritation cutanée : Consulter un médecin. • P362+P364 Retirer les vêtements contaminés et les laver avant de les remettre. • P391 Recueillir le produit déversé. • P405 Entreposer dans un endroit fermé à clé. • P501 Jeter le contenu/contenant conformément aux réglementations nationales.	Danger	Chlorure de tétraméthylammonium Concentration : 49 % CAS : 75-57-0
Amplificateur pour tampon d'hybridation		• H351 Potentiellement cancérigène. • H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. • H373 Peut causer des dommages aux organes à la suite d'expositions répétées ou prolongées. • P201 Se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation. • P202 Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.	Danger	Formamide Concentration : 100 % CAS : 75-12-7



PICTOGRAMME		Mentions de dangers et conseils de prudence	Mot indicateur	Composant dangereux
Nom du produit	SGH			
		- P260 Ne pas respirer les vapeurs/aérosols. - P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et du visage. - P308+P313 En cas d'exposition ou d'inquiétude : Consulter un médecin. - P314 Appeler un médecin en cas de malaise. - P405 Entreposer dans un endroit fermé à clé. - P501 Jeter le contenu/contenant conformément aux réglementations nationales.		
10x tampon de lavage rigoureux		- H302 Mortel en cas d'ingestion. - H315 Cause une irritation cutanée. - H319 Cause une sévère irritation oculaire.	Danger	Sel disodique d'acide éthylènediaminetétraacétique Concentration : 2,5 % CAS : 6381-92-6
10x tampon de lavage I		- H228 Solide inflammable. - H302 Mortel en cas d'ingestion. - H315 Cause une irritation cutanée. - H318 Cause de graves lésions oculaires. - H332 Mortel en cas d'inhalation. - H401 Toxique pour les organismes aquatiques. - H402 Nocif pour les organismes aquatiques. - H412 Nocif pour les organismes aquatiques, avec des effets durables à long terme. - P273 Éviter de déverser dans l'environnement. - P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et du visage. - P305+P351+P338 En cas de contact avec les yeux : Rincer avec précaution avec de l'eau pendant plusieurs minutes. Si la personne porte des lentilles de contact, elle doit les enlever, si possible. Continuer de rincer les yeux. - P310 Appeler immédiatement un centre anti-poison/médecin. - P501 Jeter le contenu/contenant conformément aux réglementations nationales.	Danger	Dodécylsulfate de sodium Concentration : 4,9 % CAS : 151-21-3
5 tampons d'ADN ligase		- H335 Peut causer une irritation respiratoire. - P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux et des oreilles.	Avertissement	polyéthylèneglycol Concentration: 1-5% CAS: 9002-93-1

Veuillez utiliser  et  comme équipement de protection individuelle.



4.1.3. Matériel requis (non fourni)

CONSOMMABLES FOURNIS PAR L'UTILISATEUR (À ACHETER SÉPARÉMENT)

- KAPA™ Library Amplification kit (Kit Amplification de bibliothèque) KK2620 (Roche Cat. Nbre : 07958978001)
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase
- Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN
- Tubes de 1,5 ml
- Tubes coniques de 50 ml
- Pointes à filtre
- Éthanol (grade biologie moléculaire)
- Réactifs de séquençage Illumina®

MATÉRIEL DE LABORATOIRE

Pour éviter la contamination de l'échantillon :

- Zone pré-PCR
 - Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
 - Support de séparation magnétique (96 puits)
 - Pipettes multicanaux (P10 ou P20 ; P100 ; P200)
 - Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)
 - Thermocycleur (couvercle chauffant à température programmable)
 - Mélangeur à vortex
- Zone post-PCR
 - Système d'électrophorèse capillaire
 - Concentrateur sous vide d'ADN
 - Bloc thermique ou bain-marie (compatible avec les tubes d'1,5 ml)
 - Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
 - Support de séparation magnétique (compatible avec les tubes d'1,5 ml)
 - Support de séparation magnétique (96 puits)
 - Pipettes multicanaux (P10 ou P20 ; P100 ; P200)
 - Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)
 - Thermocycleur (couvercle chauffant à température programmable)
 - Mélangeur à vortex



4.2. Préparation de bibliothèque

4.2.1. Préparation de l'ADN génomique

CONSOMMABLES

- ADN génomique (ADNg) double brin haute qualité
- FX Amplificateur
- IDTE
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

IMPORTANT

L'intégrité, la concentration et la pureté de l'ADN sont importantes dans cette étape. La pureté de l'ADN peut être évaluée en utilisant un spectrophotomètre à UV. Les rapports d'absorbance recommandés sont compris entre 1,8 et 2,0 pour un rapport de 260/280 et entre 1,6 et 2,4 pour un rapport de 260/230. Nous recommandons une confirmation de l'intégrité de l'échantillon par électrophorèse capillaire ou une technique équivalente. Pour éviter toute erreur avec l'ADN d'entrée, il est recommandé de procéder à une dilution initiale pour obtenir une concentration comprise entre 50 et 100 ng/μl. La concentration de l'ADN doit être confirmée par une détermination fluorimétrique (par ex. : Qubit®, Thermo Fisher) et la valeur obtenue permettra de calculer la dilution finale.

PRÉPARATION

Retirez le FX Amplificateur du congélateur à -20 °C et décongelez à température ambiante. Une fois décongelé, mélangez les réactifs en retournant doucement le tube 5 fois et centrifugez brièvement dans une microcentrifugeuse.

Selon le format du kit, le nombre d'échantillons d'ADN à regrouper par réaction de capture va varier conformément au tableau suivant : Veillez à prendre ces informations en compte avant de commencer.

FORMAT DU KIT	Kit de 16 échantillons	Kit de 32 échantillons	Kit de 48 échantillons	Kit de 96 échantillons*
Nombre de bibliothèques individuelles par capture	4	8	12	12

* Pour 96 échantillons, deux kits de 48 échantillons sont fournis et comprennent 8 réactions de capture.

PROCÉDURE

1. Préparez les barrettes PCR suivantes, conformément au nombre de réactions :

NOMBRE DE RÉACTIONS	4	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR	4 tubes	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Nombre de barrettes	1	2	3	2	3	4	6



2. Préparez une dilution pour chaque échantillon d'ADN génomique (ADNg) de haute qualité dans le nombre approprié de barrettes PCR en procédant comme suit :

DILUTION D'ADNg	
ADNg	200 ng
IDTE	Complète jusqu'à 30 µl

- Mélangez brièvement en pipettant doucement 5 fois de haut en bas, puis en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse pour recueillir tout le liquide.



Conseil : Point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C.

- En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :
 - Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, ajoutez 5 µl de FX Amplificateur dans chaque tube de la barrette à 4 tubes contenant 30 µl d'échantillons d'ADNg (soit un total de 35 µl dans chaque tube de la barrette à 4 tubes).
 - Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, procédez de la manière suivante :
 - Pour faciliter le pipetage, créez un réservoir de FX Amplificateur en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes à 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
FX Amplificateur (en µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 5 µl de FX Amplificateur des tubes précédents aux 30 µl d'échantillons d'ADNg (soit un total de 35 µl dans chaque tube des barrettes à 4 ou 8 tubes).

- À l'aide d'une pipette multicanaux configurée à 20 µl, mélangez doucement en pipettant 5 fois de haut en bas et en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse.

3. Conserver sur de la glace jusqu'à la configuration de la réaction de fragmentation enzymatique.

4.2.2. Préparation de pré-mélanges et de réactifs

COMPOSANTS ET RÉACTIFS

- FX Enzyme Mix (FX mélange enzymatique)
- FX Buffer 10x (FX Tampon 10x)
- 5 tampons d'ADN ligase
- ADN ligase
- HiFi PCR Master Mix 2x (HiFi Mélange maître pour PCR 2x)
- Primer Mix Illumina® Library Amp (Mélange d'amorces Illumina® Library Amp)
- Eau exempte de nucléase
- Billes AMPure® XP
- Éthanol



PRÉPARATION

- Retirez les composants du kit SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I du congélateur à -20 °C et laissez décongeler sur de la glace.
- Retirer la Dual Index Adapters Plate (Plaque Dual Index Adapters) du congélateur à -20 °C et la placer au réfrigérateur à 4 °C pour une utilisation ultérieure.
- Retirer les AMPure® XP beads (AMPure® XP billes) du réfrigérateur à 2-8 °C et les laisser atteindre la température ambiante en au moins 30 minutes.
- Préparer de l'éthanol frais à 80 % (volume comme suit, en fonction du nombre de réactions) :

80 % ÉTHANOL							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
80 % éthanol (en ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Lorsque les composants du SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I sont décongelés, mélangez les réactifs en retournant le tube 5-10 fois et centrifugez brièvement dans une microcentrifugeuse.

PRÉ-MÉLANGES

- Préparer le **pré-mélange réactionnel FX** comme suit :

REACTION FX PRE-MELANGE							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
10 FX tampons (en µl)	23.6	47.1	75	95	150	190	300
FX Mélange enzymatique (en µl)	47.1	94.2	150	190	300	380	600

- Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
- Conserver sur de la glace.

- Préparer le **pré-mélange pour ligation** comme suit :

PRE-MELANGE POUR LIGATION							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
DNA Ligation Buffer 5x (in µl)	95	190	300	380	600	760	1 200
ADN ligase (en µl)	47.5	95	150	190	300	380	600
Eau exempte de nucléase (en µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.



- Conservez sur de la glace.



Important : Le tampon pour ligature d'ADN est extrêmement visqueux ; pipeter doucement et veiller à obtenir un pré-mélange pour ligature homogène.

3. Préparez le **pré-mélange pour PCR** comme suit :

PRÉ-MÉLANGE POUR PCR							
Nombre de réactions	4	8	12	16	24	32	48
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	115	230	345	460	690	920	1 380
Mélange d'amorces pour amplification de bibliothèque Illumina® (en µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Eau exempte de nucléase (en µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

- Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
- Conserver sur de la glace.

4.2.3. Fragmentation enzymatique, réparation d'extrémité et poly-adénylation

CONSOMMABLES

- ADNg double brin conditionné et dilué dans 35 µl
- Réaction FX Pré-mélange
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PRÉPARATION

- Programmez le thermocycleur pour une fragmentation FX avec les paramètres suivants :

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (MINUTES)
Couvercle	70	-
Étape 1	4	1
Étape 2	32	5



	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (MINUTES)
Étape 3	65	30
Maintien	4	∞

- Démarrez le programme FX Fragmentation Lorsque le bloc atteint l'étape 1 (4 °C), mettez le programme en pause.

PROCÉDURE



Important : Veillez à toujours conserver les échantillons et le pré-mélange sur de la glace avant et après l'incubation pour bloquer la réaction enzymatique.

1. En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :

- Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, passez à l'étape 2.
- Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, pour faciliter le pipetage, créez un réservoir contenant un pré-mélange FX Réaction en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes de 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Pré-mélange FX Réaction (en µl)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Combinez les résultats comme suit :

- À l'aide d'une pipette multicanaux, dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus, ajoutez 15 µl de pré-mélange FX Réaction à chacun des 35 µl des échantillons d'ADNg (soit un total de 50 µl dans des barrettes de 4 ou 8 tubes).
- À l'aide d'une pipette configurée à 40 µl (multicanaux dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus), mélangez soigneusement en pipettant 5 fois de haut en bas et en centrifugeant brièvement dans une microcentrifugeuse.

3. Placez les échantillons dans le thermocycleur et continuez le programme FX Fragmentation.

Passez directement à la section Ligature



4.2.4. Ligature

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction FX fragmentation dans 50 µl chacun
- Pré-mélange pour ligature
- Adaptateurs à index double
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PRÉPARATION

- Sortez les plaques pour adaptateurs à index double de la température de 4 °C (transférés préalablement d'une température de -20 °C à 4 °C) et centrifugez brièvement la plaque pour recueillir tout le liquide. Consultez l'Annexe 1 pour connaître les formats de plaques respectifs.
- Pendant FX Fragmentation, préparez de nouvelles barrettes PCR avec 5 µl d'adaptateurs à double index différents par tube, conformément à votre stratégie d'indexation et de la manière suivante :

NOMBRE DE RÉACTIONS	4	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR	4 tubes	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Nombre de barrettes	1	2	3	2	3	4	6

- Configurez le thermocycleur à une température de 20 °C (couvercle ouvert)

PROCÉDURE

1. En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :

- Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, passez à l'étape 2.
- Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, pour faciliter le pipetage, créez un réservoir contenant un pré-mélange de ligature dans un nouvel ensemble de barrettes PCR, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Pré-mélange pour ligature (en µl)	100	160	100	160	200	320

2. À l'aide d'une pipette multicanaux, transférez les 50 µl de chaque produit de réaction FX Fragmentation vers les barrettes de 4 ou 8 tubes contenant 5 µl d'adaptateurs à index double.
3. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.



4. À l'aide d'une pipette multicanaux, dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus, ajoutez 45 µl du pré-mélange de ligature à chaque produit de réaction FX Fragmentation (55 µl dans chaque tube de la barrette de 4 ou 8 tubes).
5. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
6. Incubez dans le thermocycleur à 20 °C pendant 15 minutes (couvercle ouvert).



Important : Veillez à ne pas placer la ou les barrettes sur de la glace à la fin de la ligature, au risque d'altérer la liaison de l'ADN aux billes.

Passez à la section Nettoyage suite à une ligature

4.2.5. Nettoyage après ligature

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature dans 100 µl chacun
- Billes AMPure XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

1. En utilisant une pipette multicanaux, ajoutez 80 µl de billes AMPure XP dans chacun des 100 µl de produits de ligation. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
3. Placez la barrette de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
4. Éliminez avec précaution 170 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

Gardez les tubes sur le support magnétique pour les étapes suivantes.

5. Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes. Incubez pendant 30 secondes à 1 minute.
6. Éliminez l'éthanol avec précaution en vous servant d'une pipette multicanaux.
7. Répétez les étapes 5 et 6 une fois.
8. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette multicanaux P10 ou P20.
9. Séchez les billes à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.



Retirez les tubes du support magnétique.

10. En utilisant une pipette multicanaux, ajoutez 105 µl d'eau sans nucléase aux billes, puis attendez quelques secondes.

Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.

11. Placez des barrettes de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
12. En utilisant une pipette multicanaux, transférez soigneusement 100 µl de surnageant dans de nouvelles barrettes de 4 ou 8 tubes étiquetées.

Passez à la section Sélection de taille double.

4.2.6. Sélection de taille double

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature dans 100 µl chacun
- Billes AMPure XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- IDTE
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

1. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 60 µl de billes AMPure XP dans chacun des 100 µl de produits de la réaction de ligature. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
3. Placez des barrettes de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
4. À l'aide d'une pipette multicanaux, transférez soigneusement 140 µl de surnageant dans de nouvelles barrettes de 4 ou 8 tubes étiquetées et contenant 20 µl de billes AMPure XP. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois.
5. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
6. Placez les barrettes de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 3 minutes, ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
7. Éliminez avec précaution 150 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

Gardez les tubes sur le support magnétique pour les étapes suivantes.

8. Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes.
Laissez les tubes reposer verticalement entre 30 secondes et 1 minute.
9. Éliminez l'éthanol avec précaution en vous servant d'une pipette multicanaux.
10. Répétez les étapes 8 et 9 une fois.



11. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette multicanaux P10 ou P20.
12. Séchez les billes à l'air libre et à température ambiante pendant 4 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

Retirez les tubes du support magnétique.

13. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 20 µl d'IDTE aux billes. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.

Passez à la section Amplification de bibliothèque.

4.2.7. Amplification de bibliothèque

CONSOMMABLES

- Ligature avec sélection de taille double Produits et billes resuspendues dans 20 µl d'IDTE chacun
- Pré-mélange pour PCR

PRÉPARATION

Programmez le thermocycleur pour une amplification de bibliothèque avec les paramètres suivants :

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (SECONDES)	
Couvercle	99	-	
Étape 1 : Dénaturation initiale	98	120	
Étape 2 : Dénaturation	98	20	8 cycles
Étape 3 : Hybridation	60	30	
Étape 4 : Extension	72	30	
Étape 5 : Extension finale	72	60	
Maintien	10	∞	



PROCÉDURE

1. En fonction du nombre d'échantillons, procédez comme suit :

- Dans le cas du traitement de **4 échantillons**, passez à l'étape 2.
- Dans le cas du traitement de **8 échantillons ou plus**, procédez de la manière suivante :
 - a. Pour faciliter le pipetage, créez un réservoir de pré-mélange pour PCR en ajoutant les volumes suivants à un nouvel ensemble de barrettes à 4 ou 8 tubes, comme suit :

NOMBRE DE RÉACTIONS	8	12	16	24	32	48
Barrette PCR (1 barrette)	4 tubes	4 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes	8 tubes
Pré-mélange pour PCR (en µl)	65	100	65	100	130	200

2. Combinez les résultats comme suit :

- À l'aide d'une pipette multicanaux, dans le cas du traitement de 8 échantillons ou plus, ajoutez 30 µl de pré-mélange pour PCR aux produits de ligature avec sélection de taille double de la et aux billes (volume total 50 µl = 30 µl + 20 µl).
- Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.

3. Placez les tubes dans le thermocycleur et exécutez le programme Amplification de bibliothèque.



Conseil : Point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C.

4.2.8. Nettoyage après amplification

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligature dans 50 µl chacun
- Billes AMPure XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- Eau exempte de nucléase
- Tubes à faible liaison d'ADN pour le stockage des bibliothèques

PROCÉDURE

1. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 50 µl de billes AMPure XP dans chacun des 50 µl de produit PCR. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.



- Placez les barrettes de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
- Éliminez avec précaution 90 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.

Gardez les tubes sur le support magnétique pour les étapes suivantes.

- Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes.

Laissez les tubes reposer verticalement entre 30 secondes et 1 minute.

- Éliminez l'éthanol avec précaution en vous servant d'une pipette multicanaux.
- Répétez les étapes 5 et 6 une fois.
- Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette multicanaux P10 ou P20.

- Séchez les billes à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

Retirez les tubes du support magnétique.

- À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez 20 µl d'eau exempte de nucléase aux billes. Mélangez soigneusement en pipétant 10 fois. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez pour recueillir tout le liquide.
- Placez la barrette de 4 ou 8 tubes sur un support magnétique à 96 puits pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
- Transférez soigneusement 18 µl de surnageant (il est recommandé de transférer deux fois 9 µl dans cette étape) vers un nouveau tube de stockage de bibliothèque étiqueté.



Conseil : Point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.

4.2.9. Quantification et contrôle qualité individuels de la bibliothèque

CONSOMMABLES

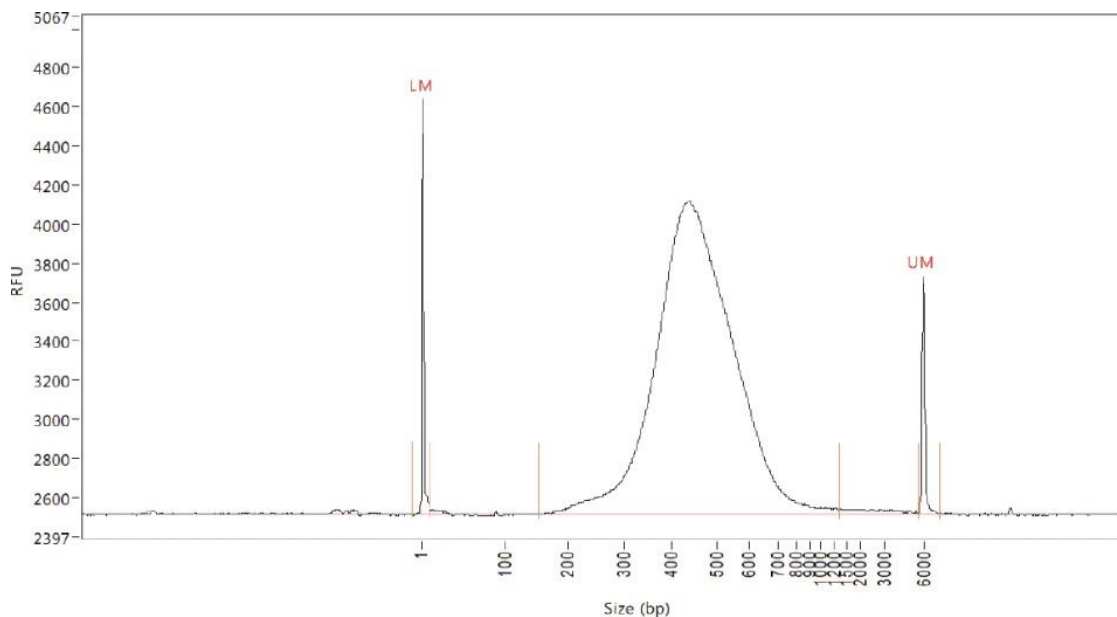
- Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
- Système d'électrophorèse capillaire
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

- Préparer une dilution quadruple de chaque bibliothèque avec de l'eau exempte de nucléase (p. ex., 2 µl de bibliothèque dans 6 µl d'eau exempte de nucléase).



- Quantifier les bibliothèques par une méthode fluorimétrique (p. ex., quantification Qubit HS utilisant 2 µl de la dilution quadruple de bibliothèque mentionnée ci-dessus).
- Contrôler la qualité des bibliothèques en analysant leur profil par électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN des bibliothèques doivent avoir une distribution de tailles comprise entre 300 pb et 700 pb.



Exemple d'une distribution de bibliothèques d'ADN obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer (Agilent analyseur de fragment). UM - Marqueur haut, LM - Marqueur bas

4.3. Capture

4.3.1. Regroupement de bibliothèques

CONSOMMABLES

- Bibliothèques individuelles
- Human Cot DNA
- Universal Blockers - TS Mix
- Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN

PROCÉDURE

- Préparez le pré-mélange suivant dans un tube à faible liaison d'ADN :

NOMBRE DE CAPTURES (Voir le tableau au point 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (en µl)	5	11	16,5	22



NOMBRE DE CAPTURES (Voir le tableau au point 3)	1	2	3	4
Universal Blockers - TS Mix (en µl)	2	4,4	6,6	8,8

- Dans le cas de deux captures ou plus, pipetez 7 µl du pré-mélange ci-dessus dans des tubes individuels à faible liaison d'ADN.
- Dans les tubes individuels contenant le pré-mélange ci-dessus, ajoutez un regroupement de bibliothèques individuelles conformément au format du kit :

FORMAT DU KIT	Kit de 16 échantillon s	Kit de 32 échantillon s	Kit de 48 échantillon s	Kit de 96 échantillon s
Nombre de bibliothèques individuelles par capture	4	8	12	12
Quantité de chaque bibliothèque par capture	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Quantité totale de bibliothèques par capture	1 200 ng	1 600 ng	1 800 ng	1 800 ng

- Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
- Faites sécher chaque mélange en utilisant un concentrateur d'ADN sous vide jusqu'à ce que le mélange soit complètement lyophilisé. Chauffez modérément (45 - 50 °C) pour accélérer la lyophilisation.



Conseil : Point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à -20 °C.

4.3.2. Hybridation

CONSOMMABLES

- Bibliothèques lyophilisées
- 2 tampons d'hybridation
- Amplificateur pour tampon d'hybridation
- Sondes Myeloid Solution
- Eau exempte de nucléase
- Barrettes de 8 tubes (0,2 ml) exempts de RNase/DNase
- Tubes d'1,5 ml
- 10x tampon de lavage I
- 10x tampon de lavage II
- 10x tampon de lavage III
- 10x tampon de lavage rigoureux
- 2x tampon de lavage de billes

PRÉPARATION

- Préchauffez le thermocycleur à 95 °C (couvercle à 99 °C).
- Après une dénaturation de 10 minutes, passez directement à une température de 65 °C (couvercle à 75 °C).



Important : Il est recommandé d'utiliser différents thermocycleurs pour les incubations à 95 °C et 65 °C, si possible.

PROCÉDURE

1. Préparez un pré-mélange d'hybridation conformément au nombre de réactions de capture :

NOMBRE DE CAPTURES	1	2	3	4
2x tampon d'hybridation (en µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Amplificateur pour tampon d'hybridation (en µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Eau exempte de nucléase (en µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Resuspendez la pastille lyophilisée dans 13 µl du pré-mélange d'hybridation.
3. Transférez la pastille resuspendue vers un nouveau tube PCR (un tube par réaction de capture).
4. Incubez dans le thermocycleur à 95 °C pendant 10 minutes.



Important : Veillez à maintenir la température du tube à 65 °C des étapes 3 à 5, afin d'éviter une mauvaise hybridation des sondes.

5. Transférez le tube PCR du thermocycleur à 95 °C vers celui à 65 °C, puis ajoutez 4 µl de sondes au mélange. À l'aide d'une pipette configurée à 13 µl, mélangez soigneusement en pipettant 5 fois de haut en bas.
6. Incubez dans le thermocycleur à 65 °C pendant 4 heures.
7. Préparez préalablement les 1x solutions de travail des différents tampons de lavage, comme expliqué dans les pages suivantes, afin qu'ils puissent s'équilibrer pendant la réaction d'hybridation.



PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 1 RÉACTION

TAMPON	STOCK TAMPON (μl)	EAU (μl)	1X VOLUME FINAL (μl)
10x tampon de lavage I	33	297	330
10x tampon de lavage II	22	198	220
10x tampon de lavage III	22	198	220
10x tampon de lavage rigoureux	44	396	440
2x tampon de lavage de billes	275	275	550



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 110 μl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 2 RÉACTIONS

TAMPON	STOCK TAMPON (μl)	EAU (μl)	1X VOLUME FINAL (μl)
10x tampon de lavage I	66	594	660
10x tampon de lavage II	44	396	440
10x tampon de lavage III	44	396	440
10x tampon de lavage rigoureux	88	792	880
2x tampon de lavage de billes	550	550	1 100



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 220 μl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 3 RÉACTIONS

TAMPON	STOCK TAMPON (μl)	EAU (μl)	1X VOLUME FINAL (μl)
10x tampon de lavage I	99	891	990
10x tampon de lavage II	66	594	660
10x tampon de lavage III	66	594	660
10x tampon de lavage rigoureux	132	1 188	1 320
2x tampon de lavage de billes	825	825	1 650



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 330 μl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.



PRÉPARATION D'UN TAMPON DE LAVAGE POUR 4 RÉACTIONS

TAMPON	STOCK TAMPON (µl)	EAU (µl)	1X VOLUME FINAL (µl)
10x tampon de lavage I	132	1 188	1 320
10x tampon de lavage II	88	792	880
10x tampon de lavage III	88	792	880
10x tampon de lavage rigoureux	176	1 584	1 760
2x tampon de lavage de billes	1 100	1 100	2 200



Important : Préchauffez 1x tampon de lavage rigoureux et aliquotez 440 µl de 1x tampon de lavage I à 65 °C dans un bloc thermostatique ou un bain-marie pendant au moins 2 heures. Conservez le tampon de lavage I restant à température ambiante.

4.3.3. Préparation des billes de streptavidine

CONSOMMABLES

- Billes de streptavidine équilibrées à température ambiante
- 1x tampon de lavage de billes
- Tubes de 1,5 ml
- Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase

PROCÉDURE

Exécutez les étapes suivantes juste avant la fin de l'incubation d'hybridation de 4 heures.

1. Mélangez les billes au vortex pendant 15 secondes.
2. Transférez 100 µl de billes par capture (200 µl pour 2 réactions, 300 µl pour 3 réactions, 400 µl pour 4 réactions) dans un seul tube de 1,5 ml.
3. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
4. Ajoutez 200 µl de 1x tampon de lavage de billes par capture (400 µl pour 2 réactions, 600 µl pour 3 réactions, 800 µl pour 4 réactions) dans le tube. Agitez au vortex pendant 10 secondes.
5. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
6. Répétez les étapes 4 et 5 une fois.
7. Ajoutez 100 µl de 1x tampon de lavage de billes par capture (200 µl pour 2 réactions, 300 µl pour 3 réactions, 400 µl pour 4 réactions) dans le tube. Agitez au vortex pendant 10 secondes.



8. Transférez 100 µl de billes nettoyées dans un nouveau tube PCR (un tube par réaction de capture).
9. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique à 96 puits et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.



Important : Veillez à ce que les billes ne s'assèchent pas.

Passez immédiatement à la section Liaison de cibles hybridées aux billes.

4.3.4. Liaison de cibles hybridées aux billes

CONSOMMABLES

- Billes de streptavidine nettoyées dans un ou plusieurs tubes PCR
- Réaction(s) d'hybridation

PROCÉDURE



Important : Travaillez avec diligence pour maintenir l'échantillon à une température proche de 65 °C.

1. Retirez la ou les réactions d'hybridation du thermocycleur et ralentissez brièvement la rotation du ou des tubes, puis remplacez-le(s) dans le thermocycleur.
2. Placez les tubes de billes de streptavidine lavés dans le thermocycleur (pas plus de deux tubes à la fois pour éviter l'assèchement des billes).
3. Pour chaque réaction d'hybridation, transférez 17 µl de solution à la réaction d'hybridation dans un tube PCR contenant des billes nettoyées. Resuspendez les billes en pipettant de haut en bas jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
4. Liez l'ADN aux billes en plaçant le(s) tube(s) dans un thermocycleur à 65 °C (couvercle à 75 °C). Incubez pendant 45 minutes.
5. Pendant l'incubation, pipettez doucement le(s) tube(s) de haut en bas toutes les 15 minutes pour maintenir les billes en suspension.

Passez directement à la section Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié.

4.3.5. Lavage des billes de streptavidine pour retirer l'ADN non lié

CONSOMMABLES

- | | |
|---|---|
| • Cibles hybridées sur des billes | • 1x tampon de lavage II |
| • Barrettes de 8 tubes de 0,2 ml exempts de RNase/DNase | • 1x tampon de lavage III |
| • Tubes de 1,5 ml à faible liaison d'ADN | • 1x tampon de lavage rigoureux (à 65 °C) |
| • 1x tampon de lavage I (1/3 à 65 °C et 2/3 à température ambiante) | • Eau exempte de nucléase |
| | • IDTE |



PROCÉDURE



Important : Veillez à maintenir une température proche de 65 °C pour les étapes 1 à 7.

Remarque : Si 2 tubes de capture ou plus sont utilisés, travaillez de manière échelonnée entre les étapes 2 et 8, notamment :

1. Lorsque le premier tube est placé dans le bloc thermique à 65 °C pour la première incubation de 5 min (étape 5), activez une minuterie.
2. Commencez le traitement du second tube.
3. Lors du placement du second tube à 65 °C, notez le temps séparant les différents tubes et veillez à respecter cet écart tout au long des étapes 2 à 8 afin de garantir un temps d'incubation exact de 5 min à 65 °C pour chaque tube avec un lavage rigoureux.

1. Ajoutez 100 µl de 1x tampon de lavage I (à 65 °C) dans chaque tube de billes de streptavidine/cible hybridé.
2. Pour chaque tube, resuspendez et transférez le mélange vers un nouveau tube d'1,5 ml à faible liaison d'ADN. Si deux tubes de capture ou plus sont utilisés, travaillez de manière échelonnée comme indiqué ci-dessus :
3. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
4. Ajoutez 200 µl de 1x tampon de lavage rigoureux (à 65 °C) dans le tube.

Resuspendez doucement les billes en pipetant.

Un mélange vigoureux des billes avec le tampon de lavage rigoureux pourrait altérer la qualité de la capture.

5. Incubez à 65 °C pendant 5 minutes.
6. Placez le tube sur un support magnétique et laissez-le reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
7. Répétez les étapes 4 et 6 une fois.

Travaillez à température ambiante.

8. Ajoutez 200 µl de 1x tampon de lavage I (à température ambiante) dans votre tube. Resuspendez doucement les billes en pipetant.

Remarque : Si 2 tubes de capture ou plus sont utilisés pour effectuer le travail ; à partir de cette étape, traitez tous les tubes simultanément.

9. Agitez au vortex pendant 2 minutes.
10. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
11. Ajoutez 200 µl de 1x tampon de lavage II dans chaque tube. Agitez au vortex pendant 1 minute.



12. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
13. Ajoutez 200 µl de 1x tampon de lavage III dans chaque tube. Agitez au vortex pendant 30 secondes. Centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
14. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
15. Ajoutez 200 µl de 1x IDTE dans chaque tube. Resuspendez les billes. Centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
16. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et laissez-le(s) reposer verticalement jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Retirez avec précaution le surnageant et jetez-le.
17. Retirez tout le liquide restant à l'aide d'une pipette P10 ou P20.
18. Ajoutez 20 µl d'eau exempte de nucléase dans chaque tube, resuspendez et transférez le mélange billes/eau vers un nouveau tube PCR.

4.3.6. Amplification post-capture

CONSOMMABLES

- Suspension de billes de streptavidine/d'eau exempte de nucléase (20 µl)
- 2 KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10 mélanges d'amorces pour amplification de bibliothèque
- Eau exempte de nucléase

PRÉPARATION

Programmez le thermocycleur pour une amplification post-capture avec les paramètres suivants :

	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (SECONDES)	
Couvercle	99	-	15 cycles
Étape 1 : Dénaturation initiale	98	45	
Étape 2 : Dénaturation	98	15	
Étape 3 : Hybridation	60	30	
Étape 4 : Extension	72	30	
Étape 5 : Extension finale	72	60	
Maintien	10	∞	



PROCÉDURE

1. Préparez le pré-mélange pour PCR comme suit :

PRÉ-MÉLANGE POUR PCR				
Nombre de réaction(s)	1	2	3	4
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (en µl)	25	55	82,5	110
10 mélanges d'amorces pour amplification de bibliothèque (en µl)	2,5	5,5	8,25	11
Eau exempte de nucléase (en µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Ajoutez 30 µl de pré-mélange pour PCR à chaque suspension de billes. Mélangez soigneusement en pipettant 10 fois de haut en bas et centrifugez brièvement.
3. Placez le(s) tube(s) dans le thermocycleur et exécutez le programme Amplification post-capture.



Conseil : Point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.

4.3.7. Nettoyage de l'amplification post-capture

CONSOMMABLES

- Produits de la réaction de ligation dans 50 µl chacun
- Billes AMPure® XP équilibrées à température ambiante
- Éthanol frais à 80 %
- IDTE
- Tubes à faible liaison d'ADN pour le stockage des bibliothèques

PROCÉDURE

1. Ajoutez 50 µl de billes AMPure® XP dans chacun des 50 µl de produits de la réaction PCR. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois.
2. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
3. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
4. Éliminez avec précaution 90 µl de surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux.
Gardez le(s) tube(s) sur le support magnétique pour les étapes suivantes.
5. Au moyen d'une pipette multicanaux, ajoutez 170 µl d'éthanol à 80 % aux billes. Laissez les tubes reposer verticalement entre 30 secondes et 1 minute.
6. Éliminez l'éthanol avec précaution.



7. Répétez les étapes 5 et 6 une fois.
8. Retirez l'éthanol résiduel en utilisant une pipette P10 ou P20.
9. Séchez les billes à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Ne séchez pas trop les billes, cela pourrait diminuer la quantité d'ADN récupérée.

Retirez le(s) tube(s) du support magnétique.

10. Ajoutez 20 µl d'IDTE aux billes. Mélangez soigneusement en pipetant 10 fois. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes et centrifugez brièvement pour recueillir tout le liquide.
11. Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que le liquide devienne transparent.
12. Transférez soigneusement 18 µl de surnageant (il est recommandé de transférer deux fois 9 µl dans cette étape) vers un nouveau tube de stockage de bibliothèque étiqueté.



Conseil : Point d'arrêt de sécurité pendant la nuit à 4 °C ou -20 °C pour un stockage prolongé.



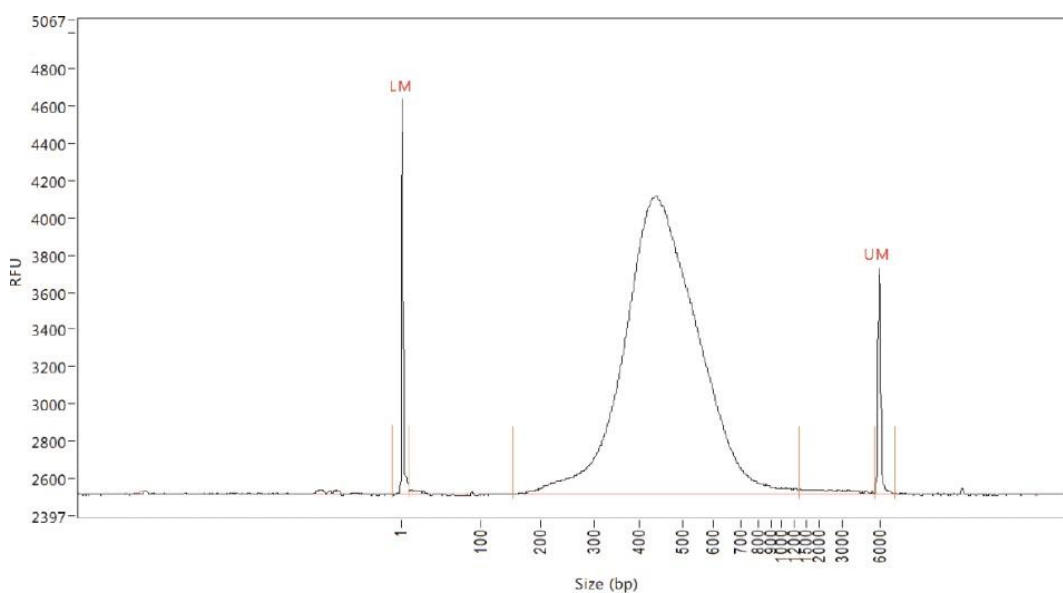
4.3.8. Quantification et contrôle qualité finals de la bibliothèque

CONSOMMABLES

- Matériel et réactifs pour la quantification fluorimétrique
- Système d'électrophorèse capillaire

PROCÉDURE

1. Quantifier chaque regroupement de bibliothèques capturé par une méthode fluorimétrique (p. ex., quantification Qubit HS utilisant 2 µl de la bibliothèque).
2. Contrôler la qualité du regroupement de bibliothèques capturé en analysant leur profil par électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN des bibliothèques doivent avoir une distribution de tailles comprise entre 300 pb et 700 pb.



Exemple de distribution de tailles d'un regroupement de bibliothèques capturé obtenue avec le système d'électrophorèse capillaire Agilent Fragment Analyzer (Agilent analyseur de fragment). UM-Marqueur haut, LM-Marqueur bas



4.4. Séquençage

4.4.1. Préparation de bibliothèque pour le séquençage

CONSOMMABLES

- Illumina MiSeq® Reagent Kit v3 (Illumina MiSeq® Kit de réactifs v3)
- Bibliothèques capturées finales
- Tampon EBT ou similaire

PROCÉDURE

1. Déterminer la molarité de chaque regroupement avec la taille moyenne de la bibliothèque (taille du pic en paires de bases) et la concentration (ng/μl) obtenue à l'étape 5.3.8 comme suit :

$$\text{Molarité de la bibliothèque (nM)} = \frac{\text{Concentration de la bibliothèque (ng/μl)}}{\text{Taille moyenne en paires de bases} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Diluer chaque regroupement à 4 nM et mélanger en quantité égale (p. ex., 5 μl de chaque). Bien mélanger et utiliser cette dilution conformément aux recommandations de dénaturation standard Illumina®.
3. Charger une dilution à 10 pM des bibliothèques dénaturées sur MiSeq®.
4. Les lectures minimum recommandées sont 2,0 million de lectures par échantillon, avec une longueur de lecture de 300 pb.

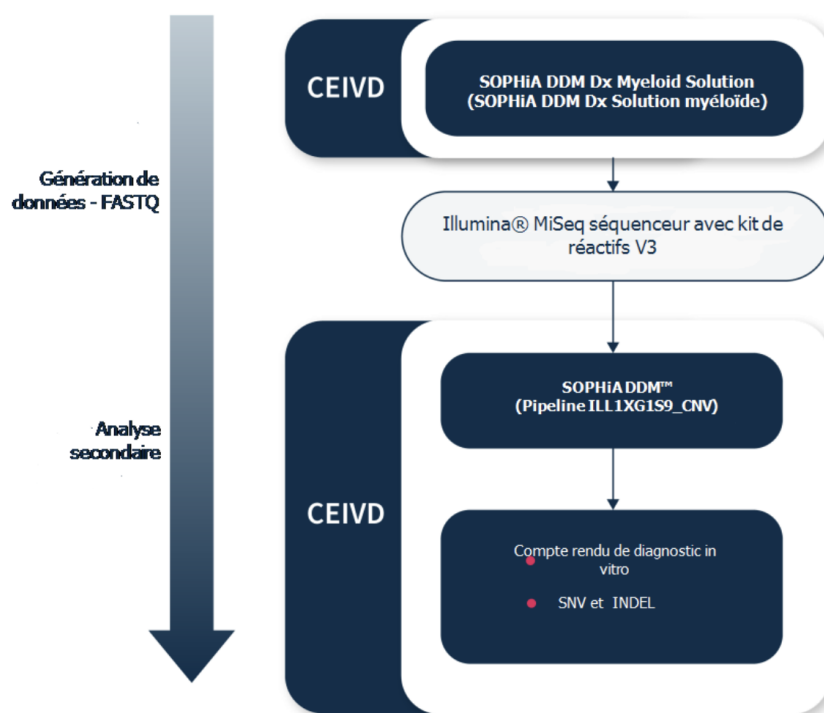


5. PROCEDURE D'ANALYSE

5.1. Instructions d'installation du SOPHiA DDM™ Dx Mode

Aucune installation n'est nécessaire pour utiliser le SOPHiA DDM™ Dx mode. Vous recevrez un e-mail avec des instructions et un lien vers le SOPHiA DDM™ Dx mode. Pour obtenir plus d'informations sur la gestion des comptes, les compatibilités avec les différents navigateurs et d'autres informations importantes, consultez le Manuel d'utilisation du SOPHiA DDM™ Dx mode. Les documents de support sont aussi disponibles directement avec SOPHiA DDM™ Dx mode.

5.2. Description du workflow d'analyses pour la génération de résultats de diagnostics in vitro (IVD)



Description du workflow d'analyse pour SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution

Pour obtenir un descriptif complet du workflow de téléchargement, consulter le Manuel d'utilisation SOPHiA DDM™ Dx mode.



6. LIMITATIONS, AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

AVERTISSEMENTS GÉNÉRAUX

- Pour des instructions détaillées sur le logiciel, consultez le manuel d'utilisation de SOPHiA DDM™ Dx mode.
- Si un élément quelconque de la manipulation, du protocole, du séquenceur, du multiplexage, etc. est modifié, les analyses ne sont pas couvertes par le mode d'emploi.
- Les données fournies dans le rapport de qualité (téléchargeable depuis la plateforme SOPHiA DDM™) le sont à titre informatif uniquement et ne sont pas destinées à être utilisées pour le diagnostic.
- L'exactitude des résultats d'analyses ne peut pas être garantie. Les laboratoires de séquençage doivent réaliser des contrôles de qualité des échantillons et marquer les échantillons disqualifiés. Les échantillons disqualifiés (p. ex., échantillon de biopsie insuffisant) pourraient aboutir à des résultats compromis. SOPHiA GENETICS n'est pas responsable des résultats et des décisions ensuite prises sur la base de ces résultats.
- Les normes et procédures des bonnes pratiques de laboratoire ainsi que le strict respect des instructions du mode d'emploi sont nécessaires pour obtenir de bonnes performances du produit. Pour des informations spécifiques relatives à la sécurité, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes fournies avec chaque composant du produit.
- Des pièces distinctes pré- et post-PCR doivent être définies afin d'empêcher la contamination des échantillons d'ADN. Utiliser systématiquement des réactifs frais, et de l'ADN correctement extrait et conservé. Pour plus de détails sur la qualité et l'intégrité de l'ADN, voir la section 5 du mode d'emploi. Matériel du kit et méthodes - Section 5.2.1 Préparation de l'ADN génomique.
- Utiliser des pipettes correctement étalonnées et un équipement de laboratoire approprié pour réaliser l'expérience.
- Ne pas mélanger des réactifs portant des numéros de lot différents.
- Toute décision relative à la prise en charge et au traitement de patients doit être fondée sur l'avis médical indépendant du médecin traitant, en tenant compte de toutes les informations applicables concernant l'état du patient, comme ses antécédents personnels et familiaux, les examens physiques, les informations apportées par d'autres tests diagnostiques et les préférences du patient, conformément aux normes de soins en vigueur dans une communauté donnée.

LIMITATIONS GÉNÉRALES

- Une mauvaise qualité des données liée à des problèmes rencontrés lors de la préparation ou du séquençage de l'échantillon peut perturber l'analyse des données et donner des résultats faux-positifs et/ou faux-négatifs.
- L'absence de variant dans le compte rendu n'exclut pas la présence d'une variation à un niveau inférieur aux limites de détection du test.



POUR DES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC IN VITRO

SNV / INDEL

- La détection de variants avec ce produit est optimisée pour la détection des SNV et des INDEL courtes (jusqu'à 2/3 de la longueur de lecture). Il est à noter que tout autre type d'altération peut ne pas être détecté par l'algorithme.
 1. Des fusions ou inversions génétiques peuvent ne pas être détectées.
 2. Des délétions ou des insertions avec breakpoint en dehors de la région cible peuvent ne pas être détectées.
- La détection de variant dans ce produit a été optimisée sur les régions définies comme « régions cibles ». Il est à noter que les régions en dehors de cette définition peuvent donner lieu à des faux-négatifs et/ou à des faux-positifs.
- Pour de bonnes performances de l'algorithme, nous recommandons une couverture d'au moins 1 000x pour obtenir une significativité statistique comparativement au bruit pour la plupart des positions. Une couverture plus faible augmente significativement le risque d'appels de variants faux-négatifs.
- Des variants peuvent ne pas être appelés ou être appelés à tort en raison de limites de conception du kit.
- Les variants présents dans les régions pour lesquelles le fragment pertinent de l'ADN n'est pas extrait par les sondes ne peuvent pas être détectés par le produit. La capture des variants peut être limitée par :
 1. des INDEL affectant l'hybridation des sondes. Ceci peut entraîner l'échec de la détection ou une estimation incorrecte de la fraction de variant.
 2. La présence d'une ou plusieurs mutations supplémentaires dans la région cible de la sonde sur le même allèle.
- Des SNV ou des INDELs dans des homopolymères d'une longueur de dix paires de bases ou plus ne peuvent pas être appelés en toute confiance car leur détection est perturbée par un bruit de fond élevé.
- Des mutations délins complexes peuvent être signalées comme variants multiples si elles sont représentées dans l'alignement comme plusieurs variants plus petits séparés par plus de 2 nucléotides.
- Des SNV ou des INDEL dans des régions de longue répétition ou de faible complexité spécifiés dans les régions avec indicateur dans l'Annexe 4 peuvent aussi ne pas être détectés.
- Les régions avec indicateur dans l'Annexe 4 présentent des caractéristiques rendant non fiable la détection de variant. Elles sont signalées avec des avertissements sur l'interface de SOPHiA DDM™, et les variants détectés dans ces régions sont rapportés avec un indicateur.
- Les régions avec homologie de séquence élevée peuvent entraîner des incertitudes dans la cartographie et le risque de ne pas détecter des variants ou d'appeler des variants incorrects.
- Les variants peuvent être représentés sous des formes différentes dans une région donnée. Si une partie des lectures rapporte le variant sous une forme différente ou ne capture pas le variant, la fraction de variant peut être sous-estimée ou le variant peut ne pas être détecté en raison d'une faible fraction de variant.
- En cas d'insertions/duplications multiples présentes dans la même région, il est possible qu'elles ne soient pas toutes rapportées correctement. En particulier, lorsqu'une petite insertion est entièrement contenue dans une



insertion plus grande, il peut ne pas y avoir de lectures identifiant de manière unique l'insertion plus petite et elle peut ne pas être détectée, seule l'insertion plus grande étant rapportée.

- En cas d'insertions/duplications multiples présentes dans la même région, il est possible qu'elles ne soient pas toutes quantifiées correctement. En particulier, lorsqu'une petite insertion est entièrement contenue dans une insertion plus grande, il peut ne pas y avoir de lectures identifiant de manière unique l'insertion plus petite, la fraction de variant rapportée pour l'insertion plus petite peut être sous-estimée et la fraction de variant pour l'insertion plus grande peut être surestimée.
- Le sample crosstalk dû à l'index-hopping peut être aggravé par les facteurs suivants :
 1. Couverture très élevée dans un ou plusieurs échantillons en raison de problèmes intervenus pendant la quantification/normalisation de l'échantillon ou des amplifications de gène de haut niveau
 2. Surcharge de la cellule d'écoulement, c'est-à-dire densité de cluster élevée
 3. Différences de taux de conservation de bibliothèque
- Le sample crosstalk en présence d'un faible niveau de contamination d'index (<1 %) peut être aggravé par les facteurs suivants :
 1. Couverture très élevée dans un ou plusieurs échantillons en raison de problèmes intervenus pendant la quantification/normalisation de l'échantillon ou des amplifications de gène de haut niveau
 2. Surcharge de la cellule d'écoulement, c'est-à-dire densité de cluster élevée
 3. Différences de taux de conservation de bibliothèque
- Il est recommandé à l'utilisateur de procéder avec prudence à l'interprétation des variants rapportés en deçà de 2,5 % et si possible d'utiliser des méthodes de tests différentes pour confirmer les résultats.
- Tout problème survenant pendant le traitement par NGS ou tout problème lié à une dégradation de l'échantillon peut entraîner un faible ratio signal/bruit et avoir un impact négatif sur l'appel de variant.
- Les altérations rapportées peuvent inclure des altérations somatiques (non héréditaires) ou de lignée germinale (héréditaires) ; cependant, le test ne permet pas de distinguer les altérations de lignée germinale des altérations somatiques. Ce test n'apporte pas d'informations sur la susceptibilité.



7. ÉVALUATION DES PERFORMANCES NON CLINIQUES

7.1. MÉTHODES

Généralités

Dans cette étude, les performances du kit SOPHiA DDM™ Dx MYS et du pipeline ILL1XG1S9_CNV de SOPHiA DDM™ Dx ont été évaluées avec les données générées sur un appareil Illumina MiSeq® en utilisant le test SOPHiA DDM™ Dx MYS. Le filtrage des variants a été configuré conformément au bruit de fond mesuré dans les échantillons de dilution de la lignée germinale et aux affirmations actuelles concernant les variants supérieurs à la limite de détection déterminée par nos essais.

Les homopolymères de 10 pb ou plus ont été exclus, tout comme les régions couvertes par moins de 1 000 lectures. Pour chaque échantillon, les variants détectés par le pipeline ont été comparés aux variants confirmés de référence fournis par chaque centre de séquençage. Tout variant détecté en dehors des régions cibles n'a pas été pris en compte (voir Annexe 4 pour obtenir la liste complète des régions cibles et des régions signalées). La couverture de la région, exon 15 de JAK2 avec un remplissage de 25 pb, était systématiquement inférieure et a donc été exclue de nos analyses.

Définitions de la sensibilité, de la spécificité, de l'exactitude, de la précision, de la répétabilité et de la reproductibilité

Chaque position ayant été analysée par la méthode de référence et la méthode combinant l'utilisation de l'appareil MiSeq® et du panel de SOPHiA DDM™ Dx MYS a été prise en compte pour calculer les paramètres de performance analytique, tels que la sensibilité, la spécificité, l'exactitude, la précision et la cohérence.

En ce qui concerne toutes les positions couvertes par le panel de SOPHiA DDM™ Dx MYS et pour lesquelles les informations de référence étaient disponibles, les nombres des catégories suivantes ont été déterminés : Des vrais positifs (True Positives (TP)) et des vrais négatifs (True Negatives (TN)) sont présents dans les deux ensembles, des faux positifs (False Positives (FP)) sont uniquement présents dans les variants détectés par SOPHiA DDM™ Dx et des faux négatifs (False Negatives (FN)) sont uniquement présents dans le tableau des variants confirmés. Toutes les positions analysées (TP+FP+TN+FN) ont été déterminées en soustrayant des positions indéterminées de la région cible du panel de SOPHiA DDM™ Dx MYS, soit CDS ± 25 pb des gènes et exons spécifiés dans la documentation de SOPHiA DDM™ Dx MYS :

- Régions indéfinies : Régions contenant des variants de faible confiance ou des variants confirmés comme étant inférieurs au seuil de déclaration et, en ce qui concerne la reproductibilité et la répétabilité, régions dont la profondeur est inférieure à 1000x (pour évaluer la reproductibilité et la répétabilité de la couverture)
- Exon 15 de JAK2, qui a été identifié comme une région dans laquelle la couverture est difficile
- Régions connues avec des artefacts (régions signalées)
- Régions ne disposant d'aucune donnée de référence ou disposant de données ambiguës (voir aussi 5.1.3). Par exemple, le séquençage Sanger ne peut pas signaler de grandes INDEL dans FLT3, ces variants ont donc été exclus.

Par ailleurs, les INDEL situées dans les régions homopolymères d'au moins 10 pb étaient exclues des calculs.



Tous les paramètres ont été calculés à l'aide des formules suivantes :

1. La **sensibilité** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des variants confirmés détectés :

$$\text{Sensibilité} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. La **spécificité** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des positions négatives correctement identifiées comme étant négatives :

$$\text{Spécificité} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(avec TN= toutes les positions analysées-TP-FP-FN)

3. L'**exactitude** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des appels corrects (positifs et négatifs) :

$$\text{Exactitude} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. La **précision** a été déterminée sous la forme d'un pourcentage des appels positifs corrects sur l'ensemble des appels positifs :

$$\text{Précision} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. La **répétabilité d'un séquençage** a été déterminée, pour chaque paire des réplicats A et B intra-run, comme le pourcentage des bases bien définies (SP) dans les deux échantillons, parmi les bases bien définies dans au moins un échantillon. Les bases sont considérées comme étant bien définies si elles sont suffisamment couvertes et qu'elles ne contiennent aucun appel de variant de faible confiance.

$$\text{Répétabilité de séquençage} = \frac{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^1}{\sum_{ie} [SP_A \cup SP_B]^1}$$

6. **Répétabilité d'un variant** : toutes les positions bien définies dans les deux réplicats sont prises en compte pour calculer la fraction des bases qui sont identiques dans les deux réplicats. Les réplicats A et B intra-run spécifiés, avec des positions SPA et SPB bien définies, SPA[i] et SPB[i] sont les états des variants à la position i. dx étant l'opérateur qui renvoie 1 lorsque x=0 et 0 lorsque x'0, la définition de la répétabilité d'un variant est donc la suivante :

$$\text{Répétabilité de variant} = \frac{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^{\delta_{SP_A[i]-SP_B[i]}}}{\sum_{ie} [SP_A \cap SP_B]^1}$$

7. La **répétabilité** a été définie comme le produit des deux mesures ci-dessus :

$$\text{Répétabilité} = \text{Répétabilité de variant} \times \text{Répétabilité de séquençage} \times 100$$

8. La **reproductibilité** a été définie de façon équivalente à la répétabilité (voir les formules (5)-(7)) pour les réplicats A et B inter-run.



Les vrais positifs (True Positives (TP)), les faux positifs (False Positives (FP)), les vrais négatifs (True Negatives (TN)) et les faux négatifs (False Negatives (FN)) ont été calculés en additionnant tous les échantillons de chaque run. La sensibilité, la spécificité, l'exactitude et la précision ont été calculées en fonction de ces totaux, conformément aux formules mentionnées ci-dessus. La spécificité, l'exactitude et la précision ont uniquement été calculées en utilisant des échantillons pleinement caractérisés en raison du manque de positions vraies négatives (True Negative (TN)) dans les échantillons partiellement caractérisés. La répétabilité et la reproductibilité ont été calculées en utilisant toutes les positions de l'ensemble des échantillons et runs pris en compte.

Pour déterminer les intervalles de confiance dans le cas d'une sensibilité de 100 % ou d'autres mesures, les méthodes décrites par Mattocks et al (2010) ont été utilisées (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). Si les critères mesurés étaient inférieurs à 100 %, la méthode exacte (Clopper, et al 1934) a alors été utilisée afin d'obtenir l'intervalle de confiance de la probabilité binomiale pour la sensibilité, la spécificité, l'exactitude et la précision (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Pour refléter la véritable diversité des variants, seuls des vrais positifs (True Positives (TP)), des faux positifs (False Positives (FP)), des faux négatifs (False Negatives (FN)) et des vrais négatifs (True Negatives (TN)) uniques ont été utilisés pour calculer l'intervalle de confiance.

7.2. DONNÉES

Les échantillons disponibles ont été divisés en deux catégories en fonction de la caractérisation de haute confiance disponible pour l'ensemble des analyses comparatives. Tout d'abord, les échantillons partiellement caractérisés, dans lesquels des variants de haute confiance connus ont été identifiés, ont été traités par SOPHiA GENETICS (Site A) ou des partenaires externes (Sites B à E), conformément aux conditions expérimentales recommandées.

Ces résultats contiennent un large éventail de cas cliniques représentatifs et permettent d'estimer la sensibilité de l'appel de variant. Des réplicats ont également été inclus pour estimer la répétabilité et la reproductibilité. La deuxième catégorie d'échantillon se compose d'échantillons de référence avec des régions de haute confiance déterminées par le fournisseur ou des variants de haute confiance Genome in a bottle (GIAB) et d'échantillons cliniques, dans lesquels la majorité des régions cibles SOPHiA DDM™ Dx MYS ont été analysées à l'aide du séquençage Sanger ou d'autres méthodes de grande précision (autorisant les limites de détection des méthodes respectives). Cet ensemble d'échantillons bien caractérisés permet de déterminer la spécificité, la précision et l'exactitude, ainsi que la sensibilité. Les données d'entrée proviennent de plusieurs runs multipatients (un fichier de séquence par patient) exécutés par quatre centres de séquençage distincts : Site A-E. Tous les fichiers d'un run ont été analysés ensemble lors du même traitement par lot.

7.3. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le tableau suivant récapitule de façon exhaustive les variants détectés et les compare à la liste des variants confirmés (Vrais positifs (True Positives (TP))/Faux négatifs (False Negatives (FN))) pour chaque run contenant des échantillons partiellement caractérisés.

Tableau 2. Récapitulatifs des différents variants obtenus à chaque run d'échantillons partiellement caractérisés

Run	Nombre d'échantillons	TP	FN
SiteA_Run01	1	15	0
SiteA_Run02	15	36	0
SiteA_Run03	16	37	0
SiteA_Run04	1	2	0



Run	Nombre d'échantillons	TP	FN
SiteA_Run06	1	15	0
SiteA_Run07	21	31	0
SiteA_Run08	20	142	0
SiteA_Run09	20	142	0
SiteA_Run10	24	599	0
SiteA_Run11	10	15	0
SiteA_Run14	8	8	0
SiteA_Run15	14	14	0
SiteB_Run01	22	78	0
SiteB_Run02	18	55	1
SiteC_Run01	11	57	0
SiteC_Run02	10	40	0
SiteD_Run01	10	15	0
SiteE_Run01	15	31	0
Total	237	1 332	1

Le tableau suivant récapitule de façon exhaustive les variants détectés et les compare à la liste des variants confirmés (Vrais positifs (True Positives (TP))/Faux négatifs (False Negatives (FN))/Faux positifs (False Positives (FP))) et les positions de base exemptes de variants (Vrais négatifs (True Negatives (TN))) pour chaque run d'échantillons entièrement caractérisés.

Tableau 3. Récapitulatifs des différents variants obtenus à chaque run d'échantillons entièrement caractérisés

Run	Nombre d'échantillons	TP	FN	FP	TN
SiteA_Run08	18	132	0	0	469693
SiteA_Run09	18	132	0	0	469231
Autre	11	152	0	2	480194
Total	47	416	0	2	1419118

Le tableau ci-dessous affiche les positions de base des vrais négatifs (True Negatives (TN)) uniques et les différents variants détectés dans cette étude d'évaluation des performances. Les positions de base dans les régions analysées totalisaient 48 093 bases. Deux cent dix-neuf (219) variants confirmés uniques ont été détectés dans l'étude. Les vrais négatifs (True



Negatives (TN)) uniques, dans lesquels des données de référence de haute confiance étaient disponibles, couvraient un total de 48 092 pb, soit 99 % des régions cibles, sauf l'exon JAK2 exclu (48 547 pb).

Tableau 4. Récapitulatifs des différents variants obtenus dans l'ensemble des runs

TP	219
FP	2
FN	1
TN	48092

7.4. RÉSULTATS

L'association de l'appareil Illumina MiSeq® ou HiSeq™, du test SOPHiA DDM™ Dx MYS et de SOPHiA DDM™ Dx entraîne une performance observée de 99,92 % de sensibilité, 99,99 % de spécificité, 99,99 % d'exactitude, 99,52 % de précision, 98,69 % de répétabilité et 99,30 % de reproductibilité.

Tableau 5. Résumé des performances

N°	Mesure des performances	Moyenne	5e percentile
A	Taux dans la cible	87,41 %	[59,59 %]
B	Homogénéité	99,88 %	[99,40 %]
C	Limite de détection	2,5 %* (observé)	[1 %]

N°	Mesure des performances	Observé	[limite inférieure IC 95 %]**
1	Sensibilité	99,92 %	[97,49 %]
2	Spécificité	99,99 %	[99,98 %]
3	Exactitude	99,99 %	[99,98 %]
4	Précision	99,52 %	[91,47 %]

N°	Mesure des performances	Observé	[limite inférieure IC 95 %]***
5	Répétabilité	98,69 %	[98,66 %]
6	Reproductibilité	99,30 %	[99,27 %]

*Pour les SNV et les INDEL ; FLT3 ITD exceptées.

**Les IC 95 % ont été calculés sur les variants uniques dans l'étude d'évaluation des performances afin de refléter la diversité réelle des variants.

***Les IC 95 % ont été calculés sur toutes les positions pour tous les échantillons. La répétabilité et la reproductibilité sont basées sur des comparaisons décrites dans les sections Équivalence de double sélection de taille et Reproductibilité inter-sites.



8. SYMBOLES

Symbole	Titre
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de référence
	Code du lot (Numéro de lot)
	Attention
	Fabricant
	Limite de température
	Date de péremption
	Conformité européenne
	Représentant agréé au sein de la communauté européenne
	Dispositif médical pour diagnostic in vitro
	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests
	Importateur
	Date de fabrication
	Consultez les avertissements et précautions à la « Section 5. Matériel du kit et méthodes »
	Consultez les avertissements et précautions à la « Section 5. Matériel du kit et méthodes »



9. ASSISTANCE

En cas de difficulté lors de l'utilisation de SOPHiA DDM™ Dx mode, consultez la section Dépannage du Manuel d'utilisation de SOPHiA DDM™ Dx mode sur le SOPHiA DDM™ Dx mode ou contactez notre assistance téléphonique au +41 21 694 10 60 ou envoyez-nous un e-mail à l'adresse support@sophiagenetics.com. Consultez le site www.sophiagenetics.com pour plus de détails. Vous pouvez aussi contacter l'assistance par demande sur le Web sur l'écran Dashboard de la section Support de SOPHiA DDM™ Dx mode.

ANNEXE 1. PLAQUES POUR ADAPTATEURS A INDEX DOUBLE

32 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	701-502	701-503	701-504					
B	702-501	702-502	702-503	702-504					
C	703-501	703-502	703-503	703-504					
D	704-501	704-502	704-503	704-504					
E	705-501	705-502	705-503	705-504					
F	706-501	706-502	706-503	706-504					
G	707-501	707-502	707-503	707-504					
H	708-501	708-502	708-503	708-504					



48 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	703-502	705-503	707-501	709-502	711-503			
B	702-501	704-502	706-503	708-501	710-502	712-503			
C	703-501	705-502	701-504	709-501	711-502	707-504			
D	704-501	706-502	702-504	710-501	712-502	708-504			
E	705-501	701-503	703-504	711-501	707-503	709-504			
F	706-501	702-503	704-504	712-501	708-503	710-504			
G	701-502	703-503	705-504	707-502	709-503	711-504			
H	702-502	704-503	706-504	708-502	710-503	712-504			

96 adaptateurs à index double compatibles avec Illumina® pour plaque à 96 puits (7 µl chacune)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701-501	702-501	703-501	704-501	705-501	706-501	707-501	708-501	709-501	710-501	711-501	712-501
B	701-502	702-502	703-502	704-502	705-502	706-502	707-502	708-502	709-502	710-502	711-502	712-502
C	701-503	702-503	703-503	704-503	705-503	706-503	707-503	708-503	709-503	710-503	711-503	712-503
D	701-504	702-504	703-504	704-504	705-504	706-504	707-504	708-504	709-504	710-504	711-504	712-504
E	701-505	702-505	703-505	704-505	705-505	706-505	707-505	708-505	709-505	710-505	711-505	712-505
F	701-506	702-506	703-506	704-506	705-506	706-506	707-506	708-506	709-506	710-506	711-506	712-506
G	701-507	702-507	703-507	704-507	705-507	706-507	707-507	708-507	709-507	710-507	711-507	712-507
H	701-508	702-508	703-508	704-508	705-508	706-508	707-508	708-508	709-508	710-508	711-508	712-508



i5	Séquences i5 pour la feuille d'échantillon
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Séquences i7 pour la feuille d'échantillon
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG

ANNEXE 2. MATERIEL DE LABORATOIRE UTILISE DANS LE LABORATOIRE DE SOPHIA GENETICS

CONSOMMABLES FOURNIS PAR L'UTILISATEUR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Barrettes de 8 tubes (0,2 ml) exempts de RNase/DNase	Thermo Fisher Scientific	EasyStrip Snap Tubes (Tubes EasyStrip Snap)	AB-2000
Tubes à faible liaison d'ADN (1,5 ml)	Axygen	MaxyClear Microcentrifuges Tubes (Tubes microcentrifuges MaxyClear)	MCT-175-C
Tubes (1,5 ml)	Eppendorf	Eppendorf Tubes (Tubes Eppendorf)	3810X
Tubes coniques (15 ml et 50 ml)	Falcon	Tubes à centrifuger coniques de 15 ml et 50 ml	352096 et 352070
Pointes à filtre	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183-1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182-1730
Éthanol (grade biologie moléculaire)	Merck	Éthanol absolu	1.00983.1000

ZONE PRÉ-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Mélangeur à vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)	Starlab	Mini Centrifuge (Mini centrifugeuse)	N2631-0007
Support de séparation magnétique à 96 puits	Alpaqua	96S Super Magnet Plate (Plaque supermagnétique 96S)	A001322
Support de séparation magnétique à 96 puits	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (Aimant latéral DynaMag-96)	12331D
Pipettes multicanaux (P10 ; P100 ; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Thermocycleur avec couvercle chauffant à température programmable	Biometra	TAdvanced 96	



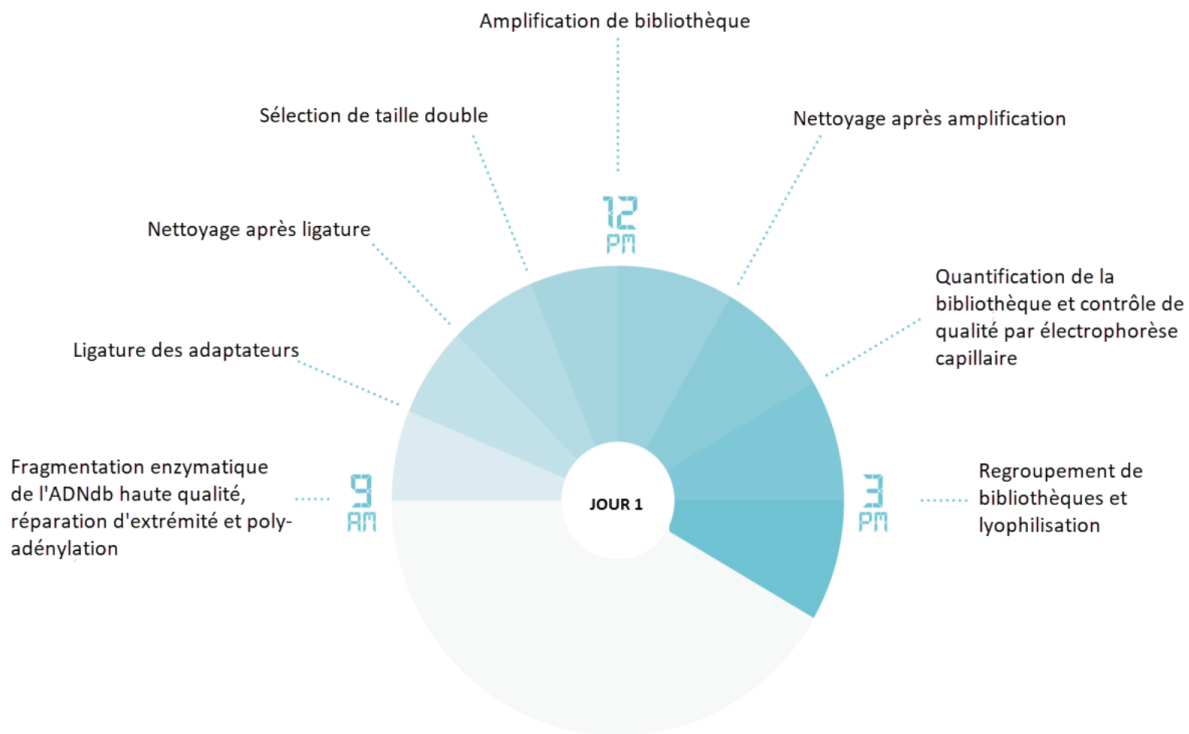
ZONE PRÉ-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Matériel et réactif pour la quantification fluorimétrique	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (Fluorimètre Qubit 3.0) et Qubit dsDNA HS Assay kit (kit de dosage d'ADNdb HS Qubit)	Q33216 et Q32854
Pipettes monocanal (P10 ; P100 ; P200 ; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000

ZONE POST-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Thermocycleur avec couvercle chauffant à température programmable	Biometra	TAdvanced 96	
Système d'électrophorèse capillaire	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Analyseur de fragments Agilent)	
Concentrateur sous vide (SpeedVac™ ou similaire)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Bain à sec ou bain-marie (compatible avec les tubes d'1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Support de séparation magnétique (compatible avec les tubes d'1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack (Support de séparation MagJET), tubes 12 x 1,5 ml	MR02
Support de séparation magnétique (96 puits)	Alpaqua	96S Super Magnet Plate (Plaque supermagnétique 96S)	A001322
Support de séparation magnétique à 96 puits	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (Aimant latéral DynaMag-96)	12331D
Mélangeur à vortex	Grant Instruments	Multi-tube Vortex Mixer (Mélangeur à vortex multitubes), V32	
Mélangeur à vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifugeuse de table (compatible avec des barrettes de 8 tubes)	StarLab	Mini Centrifuge (Mini centrifugeuse)	N2631-0007
Pipettes multicanaux (P10 ; P100 ; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Matériel et réactif pour la quantification fluorimétrique	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (Fluorimètre Qubit 3.0) et Qubit dsDNA HS Assay kit (kit de dosage d'ADNdb HS Qubit)	Q33216 et Q32854

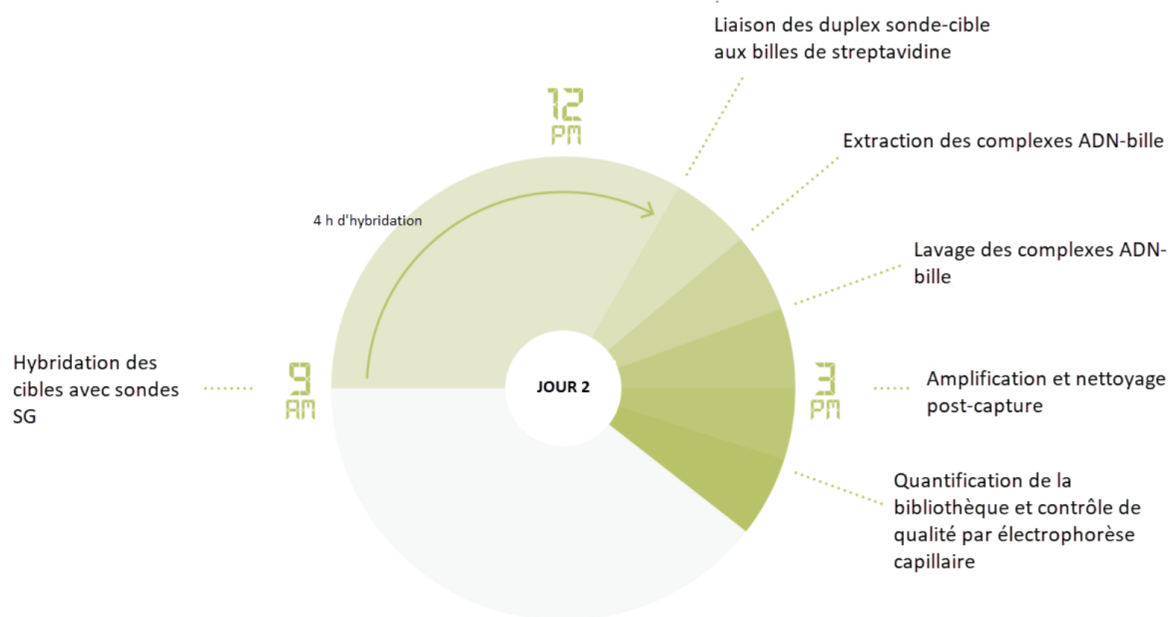


ZONE POST-PCR	FOURNISSEUR	NOM DU PRODUIT	RÉFÉRENCE CATALOGUE
Pipettes monocanal (P10 ; P100 ; P200 ; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000

ANNEXE 3. WORKFLOW GENERAL – SOPHIA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS (SOPHIA DDM™ SOLUTIONS DE CAPTURE)



Préparation de bibliothèque
Avec SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CAPTURE

FLUX DE TRAVAIL SIMPLE

- 1-4 TUBES SEULEMENT À MANIPULER (BIBLIOTHÈQUES REGROUPÉES MULTIPLEX)
- 3 HEURES DE PRÉSENCE SEULEMENT



ANNEXE 4. LISTE DES REGIONS CIBLES ET DES REGIONS SIGNALEES APPLICABLES

RÉGIONS CIBLES*

CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
1	36931671	36931826
1	36931932	36932534
1	36932805	36932937
1	36933133	36933277
1	36933397	36933588
1	36933650	36933847
1	36934731	36934883
1	36935227	36935466
1	36937008	36937272
1	36937641	36937765
1	36937813	36938017
1	36938092	36938312
1	36939010	36939248
1	36939339	36939513
1	36940952	36941299
1	36945008	36945122
1	43814908	43815055
1	115256395	115256624
1	115258645	115258806
2	25457122	25457314
2	25458550	25458719
2	25459779	25459899
2	25461973	25462109
2	25463145	25463344
2	25463483	25463624
2	25464405	25464601
2	25466741	25466876



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
2	25466998	25467232
2	25467383	25467546
2	25468096	25468226
2	25468863	25468958
2	25469003	25469203
2	25469463	25469670
2	25469894	25470052
2	25470434	25470643
2	25470880	25471146
2	25472500	25472618
2	25475037	25475091
2	25497784	25497981
2	25498343	25498437
2	25505231	25505605
2	25522982	25523137
2	25536756	25536878
2	198266440	198266637
2	198266683	198266879
2	198267254	198267575
2	198267647	198267784
2	198268283	198268513
2	198269774	198269926
2	198269973	198270221
2	209113067	209113409
4	55561652	55561972
4	55589724	55589889
4	55591997	55592241
4	55593358	55593515
4	55593556	55593733
4	55594151	55594312
4	55599210	55599383
4	55602638	55602800



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
4	106155074	106158622
4	106162470	106162611
4	106163965	106164109
4	106164701	106164960
4	106180750	106180951
4	106182890	106183030
4	106190741	106190929
4	106193695	106194100
4	106196179	106197701
5	170834678	170834803
5	170837505	170837594
7	140453049	140453218
7	148504712	148504823
7	148506137	148506272
7	148506376	148506507
7	148507399	148507531
7	148508691	148508837
7	148511025	148511254
7	148511980	148512156
7	148512572	148512663
7	148513750	148513895
7	148514288	148514508
7	148514943	148515234
7	148516662	148516804
7	148523520	148523749
7	148524230	148524383
7	148525806	148525997
7	148526794	148526965
7	148529700	148529867
7	148543536	148543715
7	148544248	148544415
9	5021962	5022238



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
9	5029757	5029931
9	5044377	5044545
9	5050660	5050856
9	5054537	5054909
9	5055643	5055813
9	5064857	5065065
9	5066652	5066814
9	5068996	5069233
9	5069899	5070077
9	5072466	5072651
9	5073672	5073810
9	5077427	5077605
9	5078280	5078469
9	5080203	5080405
9	5080507	5080708
9	5081699	5081886
9	5089648	5089888
9	5090420	5090595
9	5090713	5090936
9	5122978	5123146
9	5126307	5126471
9	5126658	5126816
9	133738124	133738447
9	133747490	133747625
9	133748221	133748449
9	133750229	133750464
9	133753776	133753979
9	133755429	133755569
11	533740	533969
11	534186	534347
11	32410578	32410750
11	32413492	32413635



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
11	32414186	32414326
11	32417777	32417978
11	32421468	32421615
11	119148850	119149032
11	119149194	119149448
12	11803036	11803119
12	11905358	11905538
12	11992048	11992263
12	12006335	12006520
12	12022332	12022928
12	12037353	12037546
12	12038834	12038985
12	12043849	12044005
12	25380142	25380371
12	25398182	25398343
12	112888096	112888341
12	112910722	112910869
12	112915429	112915559
12	112915635	112915844
12	112919852	112920034
12	112924253	112924458
12	112926221	112926339
12	112926802	112927004
13	28592578	28592751
13	28607998	28608153
13	28608193	28608376
13	28608412	28608569
15	90631793	90632004
17	7572901	7573033
17	7573901	7574058
17	7576511	7576682
17	7576827	7576951



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
17	7576993	7577180
17	7577473	7577633
17	7578151	7578314
17	7578345	7578579
17	7579286	7579615
17	7579674	7579746
17	7579813	7579937
17	74732855	74733267
18	42529820	42533330
19	13054501	13054752
19	33792218	33793345
20	31019360	31019507
20	31021061	31021745
20	31022209	31025166
21	36164406	36164932
21	36171572	36171784
21	36193939	36194018
21	36206681	36206923
21	36231745	36231900
21	36252828	36253035
21	36259114	36259434
21	36265196	36265285
21	36421113	36421221
21	44514739	44514923
21	44524399	44524537
X	15808593	15808684
X	15809031	15809161
X	15817969	15818101
X	15821785	15821944
X	15822208	15822345
X	15826330	15826419
X	15827297	15827466



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN
X	15833774	15834038
X	15836684	15836790
X	15838304	15838464
X	15840828	15841390

*Une région cible est la position où le pipeline rapportera des variants de haute confiance lorsqu'ils sont présents. Les coordonnées sont basées sur 1 et la coordonnée finale est incluse dans la région.

RÉGIONS APPLICABLES MARQUÉES D'UN INDICATEUR**

CHROMOSOME	DÉBUT	FIN	DESCRIPTION	GENE_ EXON
1	36933564	36933584	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	CSFR3_ ex14
17	7572977	7573010	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	TP53_ ex11
18	42533111	42533125	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	SETBP1_ ex04
21	36206686	36206787	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	RUNX1_ ex07
2	198267762	198267783	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts expérimentaux	SF3B1_ ex13
5	170837510	170837526	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts expérimentaux	NPM1_ ex11
9	5126453	5126462	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	JAK2_ ex24
11	119149355	119149373	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être	CBL_ ex09



CHROMOSOME	DÉBUT	FIN	DESCRIPTION	GENE_ EXON
			confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	
19	33792754	33792775	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	CEBPA_ ex01
19	33793007	33793041	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	CEBPA_ ex01
20	31022441	31022449	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts de séquençage en cas d'utilisation de la chimie Illumina® V2	ASXL1_ ex12
7	148543693	148543705	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts expérimentaux	EZH2_ ex41
17	74733013	74733013	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts expérimentaux	SRSF2_ ex1
20	31022262	31022262	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts expérimentaux entraînant des lectures chimériques	ASXL1_ ex12
18	42531410	42531410	Les variants dans cette région avec une fraction variante en dessous de 10 % peuvent être confondus en raison d'artéfacts expérimentaux entraînant des lectures chimériques	SETBP1_ ex04
12	112919878	112920009	Cette région est hautement homologue	PTPN11_ ex10

**Une région marquée d'un indicateur est une certaine région chevauchant un exon et pourrait causer une incertitude dans l'appel de variant, p. ex., faible complexité, bruit, pseudogène, etc. Cela peut dépendre de la technologie de séquençage. Un variant détecté dans cette région ne sera pas classé comme de faible confiance dans SOPHiA DDM™ Dx mais il sera associé à un triangle d'avertissement et un message d'avertissement détaillé est consultable dans l'onglet avertissements. La colonne filtre du variant correspondant dans le tableau de variant complet final ne sera pas marquée à cause de cette région. Les coordonnées sont basées sur 1 et la coordonnée finale est incluse dans la région.



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:07:34 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:56:22 GMT+0000