

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ermöglicht eine hochpräzise Variantenerkennung

Bewährt bei Vollblut- und FFPE-
Proben unter Verwendung von
Anreicherungssondenpanels
unterschiedlicher Größe



Einleitung

Bei Illumina DNA Prep with Enrichment Dx handelt es sich um eine NGS-Lösung (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) für die Bibliotheksvorbereitung und -anreicherung, die mit der Verordnung der Europäischen Union (EU) 2017/746 über *In-vitro*-Diagnostika (IVDR) konform und von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen ist. Das Kit eignet sich für ein breites Spektrum an Zugabemengen genomischer DNA (gDNA), die aus Vollblut oder FFPE-Gewebe (formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe) extrahiert wurde. In Kombination mit dem MiSeq™Dx Instrument, dem NextSeq™ 550Dx Instrument oder dem NovaSeq™ 6000Dx Instrument ermöglicht Illumina DNA Prep with Enrichment Dx klinischen Laboren die Durchführung gezielter Sequenzierungsanreicherungspanels im Rahmen ihres Angebots an Diagnoseanwendungen.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx eignet sich sowohl für Fix-Panels als auch für anwendungsspezifische Panels unterschiedlicher Größe, darunter auch Exom-Panels. Das Kit ist mit Oligonukleotid-DNA-Anreicherungspanels von Illumina und Drittanbietern kompatibel, was die Flexibilität erhöht.

Der vorliegende technische Hinweis zeigt die herausragende Leistung von Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bei der Generierung hochwertiger Sequenzierungsdaten und bei der sensitiven Bestimmung von Keimbahn- und somatischen Varianten unter Verwendung von Referenzkontrollproben sowie Vollblut- und FFPE-Proben aus der Praxis ([Abbildung 1](#)).

Die Evaluierung als Nachweis der grundsätzlichen Eignung erfolgte anhand von unterschiedlichen Anreicherungs sondenpanels von Illumina und Drittanbietern, die die Spezifikationen für die Validierung mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ([Tabelle 1](#)) erfüllen.

Tabelle 1: Illumina DNA Prep with Enrichment Dx – Anforderungen an Sondenpanels^a

| Parameter | Spezifikation |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Sondentyp | Einzel- oder Doppelstrang-DNA |
| Sondenlänge | 80 bp oder 120 bp |
| Panelgröße | 500–675.000 Sonden |
| Gesamtsondenzugabe ^b | ≥ 3 pmol |

a. Panels außerhalb dieser Spezifikationen wurden nicht validiert und gelten als nicht der Zulassung entsprechend.
b. Für die Anreicherung bei Plexitäten von 1-Plex bis 12-Plex.

Methoden

Extraktion von Proben und DNA

Bei der Evaluierung wurden folgende Proben herangezogen: das Referenzmaterial NA12878 des Coriell Institute, die durch Formalin verunreinigte Referenz-DNA Horizon HD799 sowie aus Vollblut- und FFPE-Gewebeproben aus der Praxis extrahierte DNA. Hierfür kann ein beliebiges validiertes Extraktionsverfahren verwendet werden. Weitere Informationen zur Probenvorbereitung finden Sie im [Datenblatt zu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#).

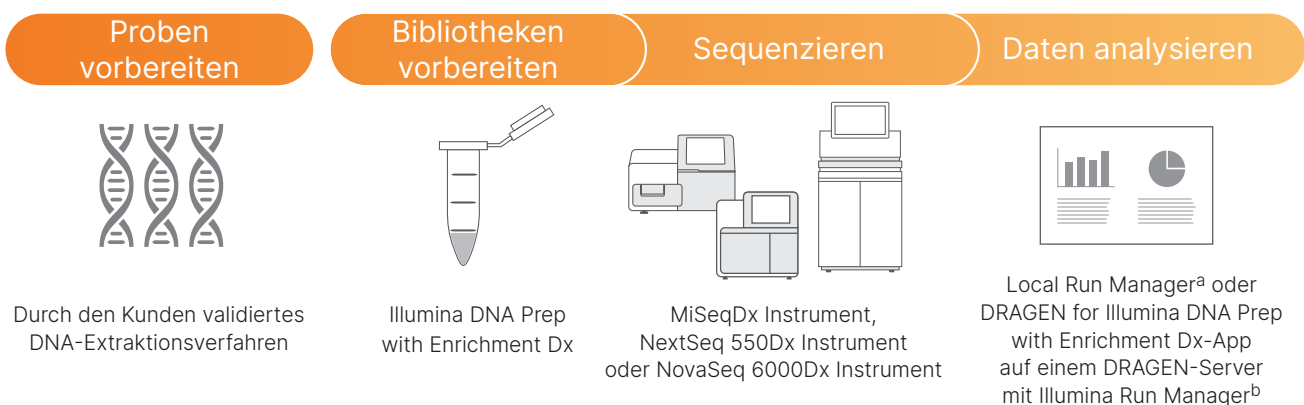


Abbildung 1: Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Workflow: Die DNA wurde gemäß Standardprotokollen extrahiert. Die Bibliotheken wurden mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx und mehreren Hybrid-Capture-Sondenpanels vorbereitet. Anschließend folgten die Sequenzierung und die Datenanalyse.

a. Verfügbar auf dem MiSeqDx Instrument und dem NextSeq 550Dx Instrument

b. Verfügbar auf dem NextSeq 550Dx Instrument und dem NovaSeq 6000Dx Instrument

Tabelle 2: Spezifikationen für das Anreicherungspanel zur Evaluierung

| Panelmerkmal | Exom-Panel I | Exom-Panel T | Großes Panel I | Mittelgroßes Panel I | Kleines Panel I |
|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------------|-----------------|
| Panelgröße | 45,2 Mb | 33 Mb | 12 Mb | 1,94 Mb | 255 kb |
| Sondengröße | 80 bp | 120 bp | 80 bp | 80 bp | 80 bp |

Panelgröße, Gesamtlänge der Sequenz in Zielregionen; Sondengröße, Länge der Pulldown-Sonde für die Anreicherung.

Bibliotheksvorbereitung und -anreicherung

Für alle Proben wurden Bibliotheken mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vorbereitet. Bei der Bibliotheksvorbereitung wurden 50 ng oder 1.000 ng extrahierte DNA oder das Gesamtvolumen als Zugabe verwendet. Die Hybridisierung wurde mit fünf unterschiedlichen Anreicherungspanels durchgeführt (Tabelle 2). Aus Vollblut- und FFPE-Proben vorbereitete Bibliotheken wurden als 12-Plex- bzw. 1-Plex-Anreicherungsreaktionen hybridisiert.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden auf dem MiSeqDx Instrument oder dem NextSeq 550Dx Instrument mit dem MiSeqDx Reagent Kit v3 bzw. dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) mit einer Read-Länge von 2 × 151 bp sequenziert.

Datenanalyse

Anhand der Base-Calls wurden mit dem GenerateFASTQ Dx Module in Local Run Manager FASTQ-Dateien generiert. Die Analyse der FASTQ-Dateien wurde mit anwendungsspezifischen Skripten durchgeführt. Die zusätzliche Analyse und Visualisierung der Daten wurde mit Microsoft Excel oder der Statistiksoftware JMP durchgeführt. Die DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-App ist eine [Option für die Sekundäranalyse](#).

Ergebnisse

Zur Evaluierung von Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wurden Bibliotheken mit unterschiedlichen Sondenpanels sequenziert und analysiert.

Tabelle 3: Assay-Leistung mit DNA-Kontrollproben bei unterschiedlichen Anreicherungspanels

| Panel | DNA-Zugabemenge (ng) | Eindeutige Padded-Read-Anreicherung | Coverage-Einheitlichkeit | Median der Fragmentlänge | SNV-Recall ^a | SNV-Präzision ^b | Indel-Recall ^a | Indel-Präzision ^b |
|-----------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Exom-Panel I | 50 | 78,65 | 95,37 % | 175 | 96,11 % | 98,16 % | 89,84 % | 84,19 % |
| | 1.000 | 80,81 | 96,35 % | 197 | 96,47 % | 99,60 % | 91,10 % | 94,05 % |
| Exom-Panel T | 50 | 93,29 | 97,50 % | 178 | 96,26 % | 99,34 % | 92,18 % | 90,27 % |
| | 1.000 | 92,69 | 97,78 % | 198 | 96,40 % | 99,63 % | 91,30 % | 96,01 % |
| Großes Panel I | 50 | 82,43 | 95,78 % | 188 | 97,91 % | 98,99 % | 89,68 % | 83,89 % |
| | 1.000 | 83,91 | 96,92 % | 213 | 98,13 % | 99,82 % | 90,70 % | 94,66 % |
| Kleines Panel I | 50 | 78,34 | 98,10 % | 180 | 98,54 % | 99,88 % | n. z. | n. z. |
| | 1.000 | 76,86 | 98,26 % | 202 | 98,54 % | 100 % | n. z. | n. z. |

a. Recall = richtig positive Ergebnisse/(richtig positive Ergebnisse + falsch negative Ergebnisse)

b. Präzision = richtig positive Ergebnisse/(richtig positive Ergebnisse + falsch positive Ergebnisse)

n. z.: nicht zutreffend

Die Leistung wurde anhand unterschiedlicher Sequenzierungsmetriken bestimmt, darunter die Coverage-Einheitlichkeit, die Padded-Read-Anreicherung und die mediane Fragmentlänge. Die Fähigkeit zum genauen Calling von Einzelnukleotid-Varianten (SNVs, Single-Nucleotide Variants) und Insertionen/Deletionen (Indels) wurde anhand von Recall- und Präzisionsmetriken bestimmt. Zunächst wurden Bibliotheken mit vier Panels aus 50 ng und 1.000 ng NA12878-Referenz-DNA vorbereitet. Es wurden hochwertige Sequenzierungsdaten generiert, anhand derer im Rahmen der Evaluierung ein genaues Keimbahn-Varianten-Calling möglich war (Tabelle 3).

Diese Ergebnisse belegen die Eignung der bei Illumina DNA Prep with Enrichment Dx eingesetzten On-Bead-Tagmentierung zur Normalisierung von Proben mit unterschiedlichen Zugabemengen mit minimalen Auswirkungen auf die Datenqualität. Dadurch können Normalisierungsschritte aus dem Protokoll entfallen, was erhebliche Zeiteinsparungen ermöglicht.

Bei der Verwendung von DNA, die aus Vollblutproben extrahiert wurde, der Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Lösung sowie dem Exom-Panel I und dem kleinen Panel I zeigte sich eine hohe Padded-Read-Anreicherung und eine entsprechende Coverage-Einheitlichkeit (Tabelle 4). Gleichmaßen zeigte sich eine hohe Coverage-Einheitlichkeit bei FFPE-Bibliotheken, die mit dem mittelgroßen Panel angereichert wurden, und bei HD799-Bibliotheken, die mit demselben Panel angereichert wurden. Dies ermöglichte das hochpräzise Calling somatischer Varianten (Tabelle 5).

Tabelle 4: Leistung mit Vollblutzugabe

| Panel | Eindeutige Padded-Read-Anreicherung | Coverage-Einheitlichkeit | Median der Fragmentlänge |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Exom-Panel I | 81,14 | 95,68 % | 203 |
| Kleines Panel I | 77,64 | 98,13 % | 193 |

Tabelle 5: Leistung mit Formalin verunreinigter Referenz- und FFPE-Zugaben aus der Anwendungspraxis

| Panel | Zugabequelle | Zugabemenge (ng) | Coverage-Einheitlichkeit | SNV-Recall |
|----------------------|--------------|------------------|--------------------------|------------|
| Mittelgroßes Panel I | FFPE | 50 | 99,24 % | n. z. |
| | | 1.000 | 99,14 % | n. z. |
| | HD799 | 50 | 96,69 % | 100 % |

Zusammenfassung

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ist eine mit EU IVDR 2017/746 konforme und von der FDA zugelassene Lösung zur Anreicherung für gezielte Sequenzierungsanwendungen, einschließlich Fix-, anwendungsspezifischer und Exom-Panels. Dieser technische Hinweis belegt die optimale Leistung des Assays für die Sequenzierung mit gezielter Anreicherung und das Calling von sowohl Keimbahn- als auch somatischen Varianten.

Weitere Informationen

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

Erklärungen zur bestimmungsgemäßen Verwendung

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (CE-IVD)

Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit enthält Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus genomischer DNA, die aus humanen Zellen und humanem Gewebe zur Entwicklung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays gewonnen wurde. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Benutzer bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenziersystemen von Illumina vorgesehen. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx enthält Software für die Einrichtung, Überwachung und Analyse von Sequenzierungsläufen.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (USA)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx besteht aus einem Satz Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus DNA verwendet werden, die aus peripherem Vollblut und formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe gewonnen wurde. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Benutzer bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenziersystemen von Illumina vorgesehen.

MiSeqDx Instrument

Das MiSeqDx Instrument ist für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, wenn sie für *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) auf dem Gerät verwendet werden. Die genomische DNA wird aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) gewonnen. Das MiSeqDx Instrument ist nicht für die Genom- oder *De-novo*-Sequenzierung vorgesehen. Auf dem MiSeqDx Instrument dürfen nur registrierte und gelistete, freigegebene oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden.

NextSeq 550Dx Instrument (USA)

Das NextSeq 550Dx Instrument ist für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, wenn sie für *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) auf dem Gerät verwendet werden. Die genomische DNA wird aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) gewonnen. Das NextSeq 550Dx Instrument ist nicht für die Genom- oder *De-novo*-Sequenzierung vorgesehen. Auf dem NextSeq 550Dx Instrument dürfen nur registrierte und gelistete, freigegebene oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden.

NextSeq 550Dx Instrument (Europäische Union/ andere Länder)

Das NextSeq 550Dx Instrument ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) vorgesehen, die auf dem Gerät durchgeführt werden. Auf dem NextSeq 550Dx Instrument dürfen nur spezielle registrierte, zertifizierte oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden.

NovaSeq 6000Dx Instrument (USA)

Das NovaSeq 6000Dx Instrument ist bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, die aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) gewonnen wurden. Das NovaSeq 6000Dx Instrument ist nicht für die Genom- oder *De-novo*-Sequenzierung vorgesehen. Das NovaSeq 6000Dx Instrument ist für spezielle registrierte, zertifizierte oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware vorgesehen.

NovaSeq 6000Dx Instrument (Europäische Union/ andere Länder)

Das NovaSeq 6000Dx Instrument ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) vorgesehen. Das NovaSeq 6000Dx Instrument ist für spezielle registrierte, zertifizierte oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware vorgesehen.



+1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566
(Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00744 DEU v3.0