

# Strumento NextSeq™ 550Dx

Una piattaforma di sequenziamento a elevata processività regolamentata dalla FDA e dotata di marcatura CE

- Supporta le esigenze dei test clinici e delle applicazioni di ricerca con lunghezze di lettura flessibili e diverse configurazioni di output
- Accelera gli studi di ricerca con rapidi tempi di elaborazione e analisi dei dati di facile utilizzo
- Accesso a una crescente pipeline di test sviluppati in laboratorio supportati dalla scienza e dall'esperienza Illumina

**illumina**®

## Introduzione

Lo strumento NextSeq 550Dx è la prima piattaforma a elevata processività, regolamentata dalla FDA e dotata di marcatura CE, che offre ai laboratori clinici l'efficienza del sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) (Figura 1). Grazie alla funzionalità dual boot, la piattaforma NextSeq 550Dx include una modalità diagnostica (Diagnostic Mode, Dx)\* e una modalità di ricerca (Research). Queste due modalità forniscono la flessibilità per eseguire test IVD, sviluppare test LDT ed eseguire la ricerca clinica su un singolo strumento.† Per grossi laboratori clinici, lo strumento NextSeq 550Dx offre una piattaforma a elevata processività convalidata e fornisce accesso a una serie di applicazioni cliniche sempre in espansione nei campi oncologico, salute riproduttiva e altro.

Lo strumento NextSeq 550Dx consente di generare più di 90 Gb di dati in meno di due giorni e offre la coerenza di una piattaforma regolamentata. Include inoltre solidi miglioramenti nella progettazione di software e strumento. Inoltre, la modalità di ricerca supporta tutte le applicazioni di ricerca attualmente disponibili inclusi sequenziamento dell'esoma, profilazione del trascrittoma, pannelli mirati progettati dal cliente e scansione di microarray. Con lo strumento NextSeq 550Dx, i laboratori clinici possono lavorare in una modalità diagnostica regolamentata per l'analisi IVD o lavorare in modalità di ricerca per accelerare gli studi clinici senza sacrificare la velocità e l'efficacia di un sequenziatore a elevata produttività.

## Accuratezza eccellente grazie alla chimica SBS Illumina

Alla base dello strumento NextSeq 550Dx vi è la chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina: la chimica NGS più ampiamente adottata al mondo.<sup>1</sup> Questo metodo basato su terminatori reversibili rileva le singole basi mano a mano che vengono incorporate in filamenti di DNA in estensione e consente il sequenziamento in parallelo di milioni di frammenti di DNA.

\* Le corse eseguite in modalità diagnostica sono processi regolamentati dagli enti regolatori degli Stati Uniti e dell'Unione Europea.

† Per maggiori informazioni sulle partnership per lo sviluppo di test IVD, rivolgetevi a un rappresentante Illumina.



Figura 1: Strumento NextSeq550Dx: sfruttando i più recenti sviluppi nella chimica SBS e i flussi di lavoro regolamentati e di facile utilizzo, lo strumento NextSeq 550Dx fornisce risultati di elevata qualità per le applicazioni cliniche e di ricerca.

La chimica SBS Illumina utilizza la competizione naturale tra tutti i quattro nucleotidi marcati, il che riduce le distorsioni dovute all'incorporazione e consente un sequenziamento più efficace di regioni ripetitive e omopolimeri.<sup>2</sup>

Rispetto al sequenziamento Sanger basato sull'elettroforesi capillare, la tecnologia NGS è in grado di rilevare un'ampia gamma di varianti del DNA, incluse le varianti di bassa frequenza e le varianti adiacenti sottoposte a determinazione delle fasi (phasing), che permette di ottenere risultati più veloci e minori fasi di interventi manuali.<sup>3,4</sup> Inoltre, i reagenti di sequenziamento NextSeq forniscono una migliore intensità di segnale e un più basso numero di falsi positivi e falsi negativi.<sup>5</sup> Con la chimica SBS di NextSeq, lo strumento NextSeq 550Dx fornisce accuratezza eccellente per i test clinici e applicazioni di ricerca.

## Semplice flusso di lavoro in tre fasi

I saggi eseguiti sullo strumento NextSeq 550Dx si attengono a un semplice processo costituito di tre fasi che include preparazione delle librerie, sequenziamento e analisi dei dati (Figura 2). Il processo in tre fasi è un flusso di lavoro completamente integrato e supportato da Illumina.



Figura 2: Processo in tre fasi del saggio NextSeq 550Dx: lo strumento NextSeq 550Dx fa parte di un processo integrato costituito da tre fasi. Con il saggio TruSeq™ Custom Amplicon Dx sono disponibili dettagliati report dei risultati.

Tabella 1: Parametri delle prestazioni dello strumento NextSeq 550Dx - modalità diagnostica<sup>a,b</sup>

Configurazione della cella a flusso	Lunghezza lettura	Output	Durata della corsa	Qualità dei dati <sup>c</sup>
Cella a flusso High-Output	2 × 150 bp	≥ 90 Gb	< 35 ore	> 75% ≥ Q30

a. Librerie generate con TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

b. Per i parametri delle prestazioni in modalità di ricerca, consultate le Specifiche per il sistema NextSeq 550.

c. Un punteggio qualitativo di Q30 corrisponde a una percentuale di errore di 0,1 nell'identificazione delle basi.

## Preparazione delle librerie

La preparazione delle librerie inizia con l'aggiunta di primer ai campioni di DNA genomico (Genomic DNA, gDNA), il che permette di generare simultaneamente librerie indicizzate per la cattura e l'amplificazione di centinaia di regioni target. Per una gamma di applicazioni cliniche, il kit di preparazione delle librerie TruSeq™ Custom Amplicon Dx supporta i pannelli di oligonucleotidi definiti dall'utente. Il kit di preparazione delle librerie è veloce ed efficiente e richiede appena 50 ng di gDNA o 10 µl di DNA derivato da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) per produrre librerie di sequenziamento di elevata qualità in meno di due giorni.

Il DNA in FFPE può essere qualificato mediante TruSeq Custom Amplicon Dx-FFPE QC Kit, che utilizza una semplice reazione qPCR per determinare la qualità del DNA in FFPE. I risultati ottenuti con FFPE QC Kit vengono utilizzati per fornire una guida sulla qualità e sulla quantità di input di DNA in FFPE.

## Sequenziamento sullo strumento NextSeq 550Dx

Con le cartucce di reagenti preriempite, l'avvio di una corsa su uno strumento NextSeq 550Dx è facile e comporta lo scongelamento, il caricamento e l'avvio in circa 30 minuti in totale di interventi manuali. L'interfaccia utente intuitiva consente ai ricercatori di eseguire diverse applicazioni di sequenziamento con formazione dell'utente o tempo di impostazione dello strumento minimi. Inoltre, lo strumento NextSeq 550Dx esegue la generazione di cluster e il sequenziamento SBS su un singolo strumento e consente una semplice transizione all'analisi dei dati integrata sullo strumento o sul cloud. Allo stesso modo del sistema NextSeq 550, lo strumento NextSeq 550Dx fornisce dati di elevata qualità con il 75% di basi sequenziate con un punteggio qualitativo pari o superiore a Q30 (Tabella 1).

La configurazione dello strumento NextSeq 550Dx è semplice, il che fornisce ai ricercatori la scalabilità necessaria per gestire progetti di diverse dimensioni da bassa processività a elevata processività. In modalità di ricerca, i ricercatori possono scegliere tra due configurazioni di cella a flusso (Mid-Output e High-Output), passando facilmente tra bassa processività e elevata processività, in base alle necessità. Con un portafoglio di soluzioni diagnostiche in espansione, i ricercatori possono facilmente scalare dallo strumento MiSeqDx allo strumento NextSeq 550Dx (Figura 3).

## Software di sistema integrato

Lo strumento NextSeq 550Dx offre software di analisi completamente integrati sullo strumento con un'architettura software modulare per supportare saggi attualmente disponibili e saggi futuri. Il software di controllo dello strumento è accessibile da un'interfaccia touch screen di facile utilizzo. Il software Local Run Manager supporta la pianificazione delle corse di sequenziamento, il monitoraggio delle librerie e le corse mediante audit trail nonché l'integrazione grazie a moduli di analisi dei dati sullo strumento. Mentre Local Run Manager viene eseguito sul computer dello strumento, l'utente può monitorare il progredire della corsa e visualizzare i risultati dell'analisi da altri computer collegati alla medesima rete. Al termine di una corsa di sequenziamento, Local Run Manager avvia automaticamente l'analisi dei dati utilizzando uno dei moduli di analisi specifico per l'applicazione.



NextSeq™ 550Dx

MiSeq™ Dx

Figura 3: Portafoglio di sistemi di sequenziamento NGS Illumina: i sistemi NGS Illumina offrono soluzioni per un'ampia gamma di applicazioni, tipi di campione e scala di sequenziamento. Ciascun sistema fornisce dati di qualità e accuratezza elevati con rendimento flessibile e flussi di lavoro semplici e ottimizzati.

## Applicazioni diagnostiche disponibili

In modalità diagnostica, lo strumento NextSeq 550Dx al momento supporta le seguenti applicazioni eseguite con il saggio TruSeq Custom Amplicon Dx:

- **Identificazione delle varianti somatiche:** con la preparazione delle librerie di campioni di gDNA derivato da FFPE, il flusso di lavoro Somatic Variant Calling offre risultati qualitativi per l'identificazione delle varianti somatiche con un limite di rilevamento di 0,05.<sup>1</sup> Il flusso di lavoro Somatic Variant Calling supporta 4-48 campioni in multiplex sullo strumento NextSeq 550Dx.
- **Identificazione delle varianti delle linee germinali:** con la preparazione delle librerie di campioni di gDNA ottenuto da sangue intero, il flusso di lavoro Germline Variant Calling fornisce risultati qualitativi per l'identificazione delle linee germinali omozigote o eterozigote. Il flusso di lavoro Germline Variant Calling supporta 8-96 campioni in multiplex sullo strumento NextSeq 550Dx.

## Identificazione delle varianti e correlazione con MiSeqDx

L'accuratezza dell'identificazione delle varianti con lo strumento NextSeq 550Dx è stata testata mediante il pannello TruSeq Custom Amplicon Variant Panel (TSAVP), un saggio rappresentativo progettato per interrogare diversi geni che coprono 12.588 basi su 23 diversi cromosomi. Il saggio TSAVP contiene inoltre un'ampia gamma di contenuto in GC (18%- 87%), Indel (fino a 25 coppie di basi) e omopolimeri (7-13 nucleotidi). L'accuratezza è stata misurata utilizzando i campioni Platinum Genome, un gruppo scelto di individui precedentemente sequenziati

Tabella 2: Identificazione delle varianti in modalità diagnostica

	N. di campioni	Durata dell'analisi <sup>a</sup>	PPA <sup>b</sup>			NPA <sup>b</sup>	OPA <sup>b</sup>
			SNV	Ins.	Del.		
Somatic Variant Caller	48	7,5 ore	99,9%	99,9%	99,9%	99,99%	99,98%
Germline Variant Caller	96	7,0 ore	> 99,9%	98,9%	100,0%	100,00%	99,99%

a. Durate medie delle analisi sullo strumento in due studi da nove corse.

b. Il valore più basso osservato di concordanza positiva espressa in percentuale (Positive Percent Agreement, PPA) per varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV), inserzioni (Ins.), delezioni (Del.), concordanza negativa espressa in percentuale (Negative Percent Agreement, NPA) e concordanza complessiva espressa in percentuale (Overall Percent Agreement, OPA) su ciascuno studio costituito da nove corse che includevano tre lotti di reagenti, tre strumenti e tre operatori. I campioni Platinum Genome sono stati analizzati utilizzando un saggio rappresentativo, TruSeq Custom Amplicon Variant Panel (TSAVP). Somatic: N = 378. Germline: N = 819.

a elevata profondità con identificazioni delle varianti a elevata affidabilità.<sup>6</sup> Le percentuali di concordanza positiva, negativa e complessiva espresse in percentuale erano molto prossime al 100%, indicando un elevato grado di accuratezza dell'identificazione delle varianti (Tabella 2).

In uno studio separato, è stata valutata la concordanza tra i campioni analizzati sia con lo strumento MiSeqDx che con lo strumento NextSeq 550Dx. I risultati dell'identificazione delle varianti somatiche sono stati ottenuti dai saggi TSAVP e TruSight™ Tumor 26 (N = 8.599) e i risultati dell'identificazione delle linee germinali sono stati ottenuti dai saggi TSAVP e TruSight Myeloid (N = 13.828). La correlazione R2 della frequenza allelica delle varianti somatiche e delle linee germinali con MiSeqDx era di 0,997 e 0,989, rispettivamente. L'affidabilità qualitativa delle identificazioni delle varianti con MiSeqDx era di  $\geq 99,8\%$  per le varianti somatiche e di  $\geq 99,6\%$  per le varianti delle linee germinali con un intervallo di affidabilità del 95% sul limite inferiore per entrambi i tipi di varianti. Nel complesso questi dati indicano un'elevata correlazione dell'identificazione delle varianti rispetto ai dati MiSeqDx.

## Scansione di array in modalità di ricerca

In modalità di ricerca, lo strumento NextSeq 550Dx offre la flessibilità sperimentale supportando sia il sequenziamento che la scansione di microarray dei BeadChip Illumina.<sup>‡</sup> Con la scansione di microarray, i ricercatori dispongono di un accesso istantaneo a una tecnologia altamente complementare per studi di follow-up, conferma delle varianti del numero di copie rilevate mediante il sequenziamento o altri campi di ricerca (Tabella 3). I flussi di lavoro integrati, dal DNA ai dati, forniscono il rapido sequenziamento di esomi, pannelli di sequenziamento mirato e trascrittomi con configurazioni delle corse Mid-Output o High-Output. Per maggiori informazioni sull'ampia gamma di applicazioni di sequenziamento e microarray supportata dallo strumento NextSeq 550Dx in modalità di ricerca, consultate le Specifiche per il sistema NextSeq 550.

<sup>‡</sup> Lo strumento NextSeq 550Dx in modalità di ricerca supporta la scansione di microarray dei BeadChip Infinium CytoSnp-850K, HumanCytoSNP-12 e HumanKaryomap-12 DNA.

Tabella 3: Parametri per la scansione di array sullo strumento NextSeq 550Dx in modalità di ricerca

BeadChip	Durata scansione per BeadChip	Durata scansione per campione
Infinium MethylationEPIC BeadChip	40 minuti	5 minuti
Infinium HumanCytoSNP-850K BeadChip	40 minuti	5 minuti
Infinium CytoSNP-12 BeadChip	40 minuti	3,3 minuti
Infinium HumanKaryomap-12 BeadChip	40 minuti	3,3 minuti

## Riepilogo

Lo strumento NextSeq 550Dx è uno strumento trasformativo che porta le funzionalità NGS a elevata processività, regolamentate dalla FDA e dotate di marcatura CE, nei laboratori clinici per applicazioni di ricerca e diagnostica. Lo strumento NextSeq 550Dx utilizza un semplice flusso di lavoro in tre fasi e ha la flessibilità necessaria per fornire dati IVD per la ricerca clinica, in cui il tempo è cruciale, e per rispondere ai quesiti più recenti nel campo della ricerca clinica. Lo strumento NextSeq 550Dx offre flussi di lavoro regolamentati e rapidi per le applicazioni di identificazione delle varianti somatiche e delle linee germinali e fornisce accesso al gruppo di saggi clinici supportati dalla tecnologia NGS Illumina in continua crescita.

## Maggiori informazioni

Strumento NextSeq 550Dx, [illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-dx.html](https://illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-dx.html).

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Strumento NextSeq 550Dx	20005715
NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (75 cicli) <sup>a</sup>	20028870
NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) <sup>a</sup>	20028871
TruSeq Custom Amplicon Kit Dx <sup>a</sup>	20005718
TruSeq Custom Amplicon Kit Dx FFPE QC Kit <sup>a</sup>	20006259
Filtro dell'aria NextSeq	20022240

a. I materiali di consumo per il sequenziamento di Classe I sono forniture in singolo lotto, lotti di kit per l'analisi, dispongono di notifiche avanzate di modifica e dispongono di un Certificate of Analysis (Certificato di analisi) per ciascun lotto. I reagenti sono sviluppati in base a principi di controllo della progettazione, fabbricati in base alle attuali buone pratiche di fabbricazione (Current Good Manufacturing Practices, cGMP) e verificati per assicurare la conformità alle specifiche.

## Bibliografia

1. Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc. 2017.
2. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry](#). *Nature*. 2008;456(7218):53-59.
3. Shokralla S, Porter TM, Gibson JF, et al. [Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform](#). *Sci Rep*. 2015;5:9687.
4. Precone V, Monaco VD, Esposito MV. [Cracking the Code of Human Diseases Using Next-Generation Sequencing: Applications, Challenges, and Perspectives](#). *Biomed Res Int*. 2015;161648.
5. Illumina (2017). [Scheda tecnica del sistema di sequenziamento NextSeq 550](#). Consultato il 10 febbraio 2021.
6. Eberle MA, Fritzilas E, Krusche P, et al. [A reference data set of 5.4 million phased human variants validated by genetic inheritance from sequencing a three-generation 17-member pedigree](#). *Genome Res*. 2017;27:157-164.

## Specifiche dello strumento

### NextSeq 550Dx

Parametro	Specifica
Configurazione dello strumento	Monitoraggio RFID dei materiali di consumo
Computer di controllo dello strumento	Processore: Dual Intel Xeon E5-2648L v3 CPU da 1,8 GHz, Memoria: 128 GB Disco rigido, modalità diagnostica: 2 × 2 TB (RAID 1) Disco rigido, modalità di ricerca: 2 × 2 TB (RAID 1) Sistema operativo: Windows 10
Ambiente operativo	Temperatura: da 19 °C a 25 °C (22 °C ± 3 °C) Umidità: 20%-80% senza condensa, umidità relativa Altitudine: 0-2.000 m Ventilazione: fino a 2.048 BTU/ora @ 600 W Per uso esclusivo in interni
Diodo a emissione luminosa (LED)	Verde 510-525 nm, Rosso 645-655 nm; Diodo laser: 780 nm, Class IIIb
Dimensioni	L × P × A: 54 cm × 69 cm × 58 cm Peso: 84,4 kg, Peso imballato: 163,3 kg
Requisiti di alimentazione	100-120 V c.a. 15 A, 220-240 V c.a. 10 A
Identificazione a radio frequenza (RFID)	Frequenza: 13,56 MHz Potenza: corrente fornita 120 mA, potenza di output RF 200 mW
Sicurezza e conformità del prodotto	Certificato da un laboratorio NRTL (Nationally Recognized Testing Laboratory) Marcatura IEC 61010-1 CE Approvato FCC/IC

## Dichiarazioni di uso previsto

### Uso previsto dello strumento NextSeq 550Dx (Unione Europea/altro)

Lo strumento NextSeq 550Dx è previsto per il sequenziamento di librerie di DNA quando utilizzato con saggi per diagnostica in vitro (IVD) eseguiti sullo strumento. Lo strumento NextSeq 550Dx deve essere utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati, certificati o approvati.

### Uso previsto dello strumento NextSeq 550Dx (Stati Uniti)

Lo strumento NextSeq 550Dx è previsto per il sequenziamento mirato di librerie di DNA ottenute da DNA genomico umano estratto da sangue intero periferico o da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), quando utilizzato con i saggi diagnostici in vitro (IVD) sullo strumento. Lo strumento NextSeq 550Dx non è previsto per il sequenziamento dell'intero genoma o il sequenziamento de novo. Lo strumento NextSeq 550Dx deve essere utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati ed elencati, autorizzati o approvati.

### Uso previsto di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo utilizzato per preparare le librerie di campioni ottenute da DNA estratto da sangue intero periferico e tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). I reagenti specifici per l'analisi forniti dall'utente sono richiesti per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico. Le librerie di campioni generate sono previste per l'uso sugli analizzatori per le sequenze di DNA a elevata processività Illumina.

### Uso previsto di TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC Kit

TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC Kit Illumina è un set di reagenti utilizzato per determinare il potenziale dell'amplificazione del DNA genomico (gDNA) estratto da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

**illumina**<sup>®</sup>

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per specifiche informazioni sui marchi, può consultare [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00035 ITA v3.0