

# Detección de variantes somáticas raras en muestras tumORALES FFPE con Illumina Cell- Free DNA Prep with Enrichment

- Los identificadores moleculares únicos para la corrección de errores permiten una mayor precisión durante la secuenciación.
- Compatible con paneles de enriquecimiento suministrados por el usuario para un diseño de experimentos flexible.
- El flujo de trabajo flexible es compatible con ADN extraído tanto de biopsias líquidas como de muestras de tejido FFPE.



## Introducción

Las muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE, formalin fixed, paraffin-embedded) son una importante fuente de materiales para la caracterización molecular de los tumores. Desafortunadamente, el proceso de fijación e inclusión en parafina de las muestras de tejido puede provocar fragmentación, reticulación o modificaciones químicas de los ácidos nucleicos.<sup>1</sup> Esto da lugar a un ácido nucleico de calidad variable o baja que puede hacer que el análisis genético del tumor sea difícil, especialmente para detectar mutaciones raras. Por este motivo, son necesarios flujos de trabajo de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) robustos y sensibles para procesar los materiales de entrada a partir de muestras FFPE para análisis sucesivos.

La combinación de los hallazgos del análisis genómico de biopsias de tejido con datos complementarios de biopsia líquida proporciona una visión profunda de la biología tumoral. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment es un kit de preparación de librerías que puede utilizarse para preparar librerías listas para el secuenciador tanto de ADN tumoral circulante (ADNtc) como de ADN genómico (ADNg) extraídas de muestras de tejido FFPE (figura 1). El flujo de trabajo incluye identificadores moleculares únicos (UMI, unique molecular identifier) para la corrección de errores y la reducción de falsos positivos, lo que permite una detección precisa y sensible de mutaciones de baja frecuencia en muestras tumorales FFPE. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment es compatible con sondas o paneles de enriquecimiento de Illumina y de terceros para adaptarse a un diseño de experimentos flexible. Esta nota de aplicación demuestra el excelente rendimiento de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment para generar librerías de NGS de alta calidad e identificar variantes somáticas de baja frecuencia empleando muestras FFPE.

## Métodos

### Muestras

Se prepararon librerías a partir de una combinación de muestras FFPE de tejido humano y de líneas celulares FFPE (tabla 1). Las líneas celulares FFPE analizadas procedían de Horizon Discovery (N.º de catálogo HD301 y HD653) y de SeraCare Life Sciences\* (FFPE TST Custom DNAv2). Illumina Biological Specimen Inventory System proporcionó las muestras de tejido humano FFPE. El ADN FFPE se extrajo con AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, N.º de catálogo 80234), se cuantificó con Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, N.º de catálogo Q32850), y se cualificó con TruSeq Custom Amplicon Dx-FFPE QC Kit (Illumina, N.º de catálogo 20006259).

### Fragmentación de ADN

La fragmentación del ADN utilizada fue mecánica. El ADN extraído de muestras FFPE se diluyó en tampón de Tris-EDTA (TE) hasta 0,23 ng/μl para una entrada de 10 ng, hasta 0,45 ng/μl para un aporte de 20 ng o hasta 0,90 ng/μl para un aporte de 40 ng. A continuación, se trataron con ultrasonidos 52 μl de cada muestra diluida en un pocillo de un 8 microTUBE Strip (Covaris, N.º de catálogo 520053) en un ultrasonificador Covaris LE220 Focused (tabla 2).

\*SeraCare Life Sciences ahora forma parte de LCG Diagnostics.



Figura 1: flujo de trabajo de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment para el procesamiento de muestras FFPE.

Tabla 1: muestras analizadas con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

ID de la muestra	Tipo de muestra	Origen de la muestra	Valor de $\Delta Cq$
8752	Tejido FFPE (humano)	Cáncer de pulmón no microcítico	5,7
315	Tejido FFPE (humano)	Cáncer de pulmón no microcítico	5,5
4075	Tejido FFPE (humano)	Cáncer colorrectal	4,2
679	Tejido FFPE (humano)	Cáncer de mama	4,1
11883	Tejido FFPE (humano)	Cáncer colorrectal	2,9
3952	Tejido FFPE (humano)	Cáncer de mama	2,2
448	Tejido FFPE (humano)	Cáncer de pulmón no microcítico	2,1
449	Tejido FFPE (humano)	Cáncer de pulmón no microcítico	1,5
FFPE TST Custom DNAv2	Línea celular FFPE	N/P	0,87
HD653	Línea celular FFPE	N/P	-1,23
HD301	Línea celular FFPE	N/P	-1,87

Tabla 2: ajustes de fragmentación recomendados para los ultrasonificadores Covaris

Ajuste	Covaris LE220	Covaris E220	Covaris ME220
Potencia incidente máxima	450 vatios	175 vatios	50 vatios
Factor de trabajo	30 %	10 %	30 %
Ciclos por ráfaga	200	200	1000
Duración del tratamiento	250 s	280 s	10 s
Temperatura	7 °C	7 °C	12 °C
Repeticiones de pulso	N/P	N/P	20
Potencia promedio	N/P	N/P	15 vatios
Otro	N/P	Intensificador	Guía de ondas

Los datos utilizados en este estudio se generaron con el ultrasonificador Covaris LE220 Focused.

## Enriquecimiento y preparación de librerías

Después del tratamiento con ultrasonidos, se prepararon librerías con el ADN fragmentado siguiendo las instrucciones proporcionadas en la guía del usuario de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Se emplearon protocolos de enriquecimiento específicos en función del tipo de panel y del formato de enriquecimiento. En este estudio se utilizaron dos paneles de enriquecimiento: un panel diseñado a medida de 2000 kb de ADN de una sola cadena (ADNmc) de 80 pb y un Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel de 37,5 Mb de ADN de cadena doble (ADNbc) de 120 pb. El enriquecimiento se realizó siguiendo el flujo de trabajo de enriquecimiento de 1 unidad de plexado o de 4 unidades de plexado descrito en la [Guía del usuario de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#).

## Secuenciación

Las librerías enriquecidas con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel se secuenciaron<sup>†</sup> en NovaSeq™ 6000 System con una profundidad de lectura de 2 × 151 pb. El resto de librerías se secuenció en NextSeq™ 550 System con una profundidad de lectura de 2 × 149 pb.

<sup>†</sup> Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment es compatible con todos los sistemas de productividad media a alta de Illumina. Sin embargo, solo se ha demostrado el rendimiento de la librería empleando muestras FFPE en NovaSeq 6000 System y NextSeq 550 System.

## Análisis de datos

Para el análisis de datos basado en la nube, los datos de secuenciación sin procesar (archivos BCL) se desmultiplexaron y convirtieron en archivos FASTQ en BaseSpace™ Sequence Hub. El análisis secundario posterior se realizó con la aplicación DRAGEN™ Enrichment v4.0.3 habilitando Somatic Small Variant Caller con los ajustes por defecto. Como genoma humano de referencia se utilizó UCSC hg 19 Alt-Aware. Los ajustes de UMI estaban activados (ON) con la llamada de variantes sensible a UMI ajustada a «Low Depth» (baja profundidad). El número mínimo de lecturas de respaldo para UMI se ajustó a 1. Se habilitó Variant Annotation (anotación de variantes) de Illumina Connected Annotation (anteriormente conocido como Nirvana) para el marcaje de la línea germinal, con argumentos de línea de comandos de DRAGEN adicionales.† Las variantes que pasaban el filtro se filtraron con bcftools 1.17 y se compararon frente a variantes constatadas con rtf vcfeval 3.12.1.

## Resultados

A fin de demostrar el excelente rendimiento de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment a la hora de generar librerías de secuencias de alta calidad a partir de ADN FFPE, se evaluaron las métricas clave de rendimiento para el ADN extraído de líneas celulares FFPE y muestras tumorales FFPE.

### Métricas de rendimiento de librerías excelentes para muestras FFPE

La cobertura media de objetivos se evaluó con dos profundidades de secuenciación, grupos de 10 M y 20 M, para garantizar que las librerías preparadas tuvieran la profundidad de cobertura necesaria en las regiones objetivo para permitir la detección de variantes de baja abundancia. Los hallazgos demuestran que el ADN FFPE de alta calidad ( $\Delta Cq \leq 2$ ) genera librerías que alcanzan una profundidad media de cobertura de objetivos superior a 100× incluso con aportes de tan solo 10 ng de ADN (figura 2). La cobertura disminuye con muestras de baja calidad (mayor  $\Delta Cq$ ), pero se puede mejorar con una secuenciación más profunda o un aumento del aporte (figura 2B). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit produce librerías con fragmentos de longitud superior a 110 pb y ofrece datos de secuenciación de alta calidad, evaluados como enriquecimiento de lectura y porcentaje de objetivos con una cobertura  $\geq 50\times$  para muestras FFPE con  $\Delta Cq \leq 4$  (figura 2C).

† --umi-verbose-metrics true --umi-start-mask-length 1 --umi-end-mask-length 3 --germline-tagging-db-threshold 10 --tmb-enable-proxi-filter true --vc-enable-germline-tagging true

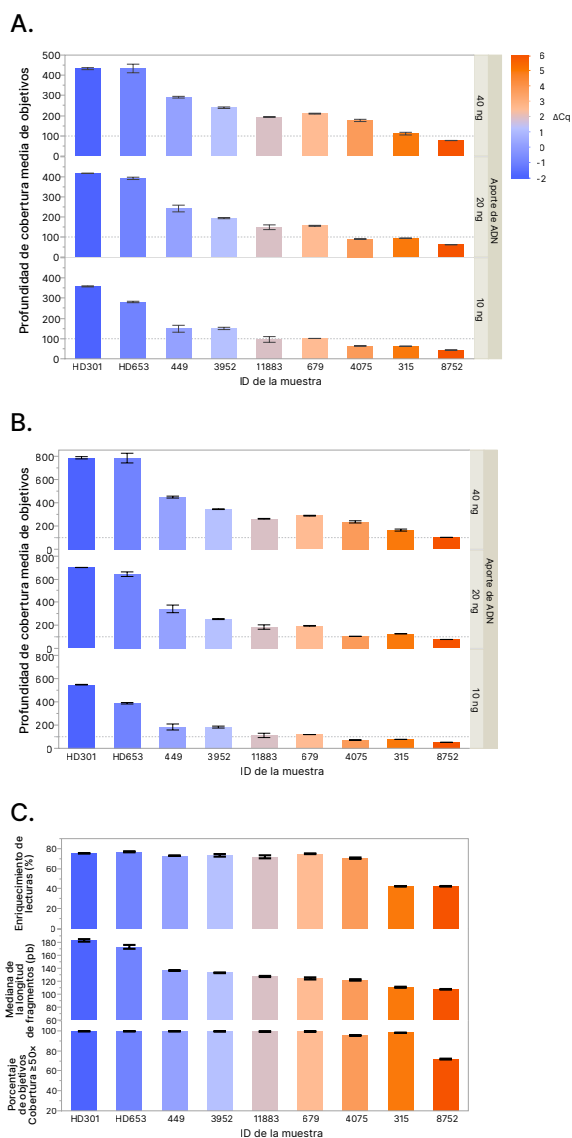


Figura 2: métricas de rendimiento para librerías preparadas a partir de muestras FFPE con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Se prepararon librerías por triplicado con ADN extraído de líneas celulares FFPE (HD301 y HD653) y tejidos FFPE de tumores de mama, colon y pulmón de diferentes calidades y cantidades de entrada (10 ng, 20 ng y 40 ng). Las muestras se representan gráficamente de izquierda a derecha en orden de calidad decreciente, como indica el valor de  $\Delta Cq$ , siendo el azul las muestras de la más alta calidad y el rojo las de la más baja calidad. Las librerías se enriquecieron con un panel 2000 kb de ADNmc de 80 pb y se secuenciaron en NextSeq 550 System a  $2 \times 149$  pb. La cobertura media de objetivos se evaluó con dos profundidades de lectura, grupos de (A) 10 M y (B) 20 M. (C) Métricas adicionales de rendimiento de librerías para muestras FFPE. Los datos mostrados corresponden a 20 ng de aporte de ADN y grupos de 20 M.

## Detección sensible de variantes de baja frecuencia

La sensibilidad de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit para detectar variantes de un solo nucleótido (SNV, single-nucleotide variant) y mutaciones de inserción y deleción (indel) se determinó mediante una línea celular FFPE personalizada que portaba variantes asociadas al cáncer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment demostró una alta sensibilidad analítica, con la capacidad de detectar aproximadamente un 90 % de SNV entre el 1 % y el 2 % de frecuencia alélica de variantes (VAF, variant allele frequency) (figura 3, tabla 3). La sensibilidad para la detección de indel por encima del 2 % de VAF fue superior al 80 % (figura 3, tabla 3).

## Compatibilidad con formatos de enriquecimiento de 1 y 4 unidades de plexado

Se lograron métricas de rendimiento comparables, incluida la profundidad media de cobertura de objetivos, el porcentaje de objetivos con una cobertura  $\geq 50\times$  y el porcentaje de enriquecimiento de lecturas para los formatos de enriquecimiento de 1 y 4 unidades de plexado en las muestras con una calidad que oscila entre  $\Delta Cq$  1,5 y 4,2 (figura 4).

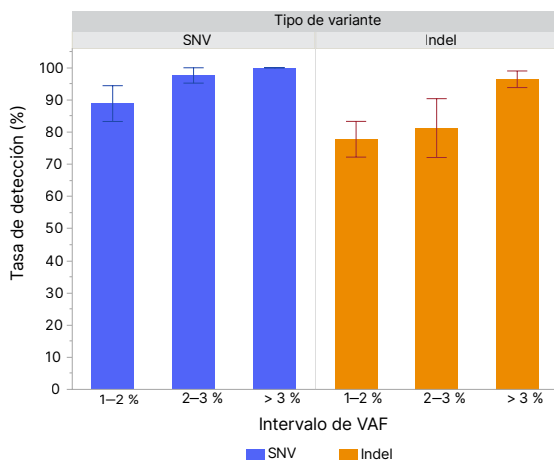


Figura 3: detección de variantes con bajas frecuencias de alelos. Las variantes se diluyeron a al menos tres niveles de frecuencia de alelos objetivo con ADN FFPE de una muestra de línea celular de tipo natural (GM24385). Se prepararon seis réplicas de librerías con un aporte de 10 ng de ADN por nivel de frecuencia de alelos y se enriquecieron con un panel de 2000 kb de ADNmc de 80 pb siguiendo el flujo de trabajo de enriquecimiento de 1 unidad de plexado. Las librerías se secuenciaron en NextSeq 550 System a  $2 \times 149$  pb. Las lecturas de secuenciación se submuestrearon en grupos de 20 M. Se evaluó la tasa de detección ( $n/6$ ) para cada tipo de variante en diferentes intervalos de VAF.

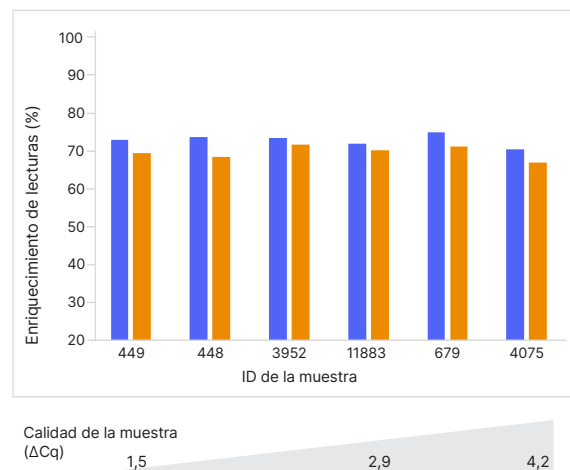
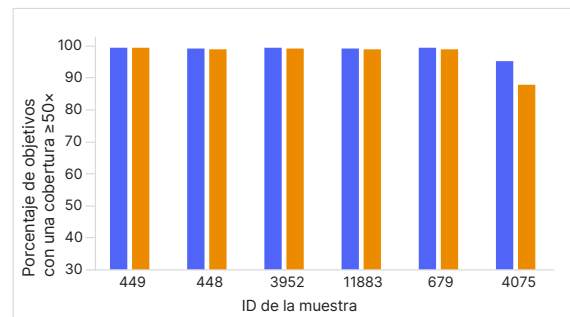
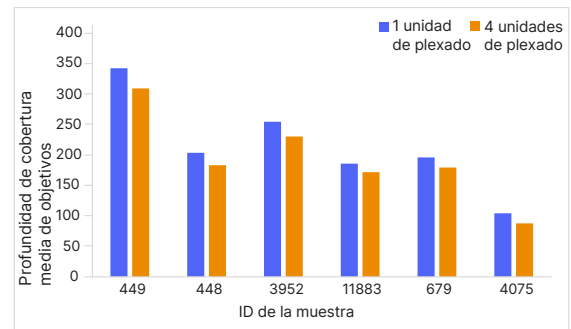


Figura 4: métricas de rendimiento en formatos de enriquecimiento de 1 y 4 unidades de plexado. Las librerías de muestras de ADN de tejido FFPE seleccionadas (20 ng de aporte de ADN) con diferentes  $\Delta Cq$  se enriquecieron individualmente con un panel de 2000 kb de ADNmc de 80 pb (1 unidad de plexado, barras azules). Se volvieron a enriquecer las mismas librerías con el mismo panel siguiendo el formato de enriquecimiento multiplexado (4 unidades de plexado, barras naranjas). Las librerías se secuenciaron en NextSeq 550 System a  $2 \times 149$  pb y las lecturas de secuenciación se submuestrearon en grupos de 20 M.

Tabla 3: resumen de variantes somáticas individuales detectadas con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

ID de COSMIC	Gen	Tipo de variante	Cambio de aminoácido	VAF detectada (%) <sup>a</sup>	N.º de réplicas detectadas <sup>b</sup>
COSV51614178	<i>MLH1</i>	SNV	p.V384D	2,0	6
COSV57169334	<i>MYD88</i>	SNV	p.L273P	2,3	6
COSV58963463	<i>CSF3R</i>	SNV	p.T618I	2,6	6
COSV55545304	<i>KRAS</i>	SNV	p.K117N	2,9	6
COSV50630049	<i>CBL</i>	SNV	p.L380P	2,9	5
COSV61615239	<i>IDH1</i>	SNV	p.R132H	3,0	5
COSV52274101	<i>MSH6</i>	SNV	p.E1322*	3,5	6
COSV59205440	<i>SF3B1</i>	SNV	p.G742D	3,9	6
COSV56057713	<i>BRAF</i>	MNV	p.V600K	2,1	6
COSV64288359	<i>PTEN</i>	Del	p.C250Wfs*2	2,3	6
COSV56542602	<i>VHL</i>	Del	p.P99Qfs*60	2,5	6
COSV52740986	<i>TP53</i>	Del	p.K291Tfs*48	2,7	6
COSV55388067	<i>KIT</i>	Del	p.W557_E561del	3,2	5
COSV61376874	<i>ARID1A</i>	Del	p.A339Lfs*24	3,2	6
COSV62688630	<i>CTNNB1</i>	Del	p.S45del	4,7	6
COSV67575778	<i>JAK2</i>	Del	p.N542_E543del	5,3	5
COSV56060749	<i>BRAF</i>	Ins	p.T599dup	1,9	6
COSV55386625	<i>KIT</i>	Ins	p.A502_Y503dup	2,8	6
COSV64290304	<i>PTEN</i>	Ins	E242Lfs*15	3,1	6
COSV51766549	<i>EGFR</i>	Ins	p.A767_V769dup	3,5	6
COSV51772596	<i>EGFR</i>	Ins	p.N771_H773dup	3,6	6
COSV57195669	<i>CEBPA</i>	Ins	p.H24Afs*84	5,0	6

a. Promedio de réplicas detectadas.  
b. De un total de 6 réplicas.

## Excelente rendimiento de librerías con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel generó de forma sistemática librerías de más de 150 pb de longitud a partir de líneas celulares FFPE (figura 5). Se lograron métricas de alto rendimiento para todas las librerías preparadas con un aporte de al menos 20 ng, incluido el enriquecimiento de lecturas, el porcentaje de lecturas alineadas y la uniformidad de la cobertura. Las métricas de rendimiento fueron comparables entre las librerías enriquecidas con 1 y 4 unidades de plexado.

## Detección sensible de variantes con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

El impacto de la profundidad de secuenciación en la cobertura media de la diana y la detección de variantes se evaluó para librerías enriquecidas con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Los resultados demuestran que se logró una cobertura media de objetivos de hasta 500× cuando se secuenciaron ocho librerías de exoma en un carril de celda de flujo S4 de NovaSeq 6000 (figura 6). Cuando las lecturas de secuenciación se submuestrearon a un total de 200 M y 400 M de lecturas que pasan el filtro, las librerías lograron una cobertura media del objetivos de aproximadamente 150× y 300×, respectivamente, independientemente de las cantidades de entrada y la plexicidad de enriquecimiento.

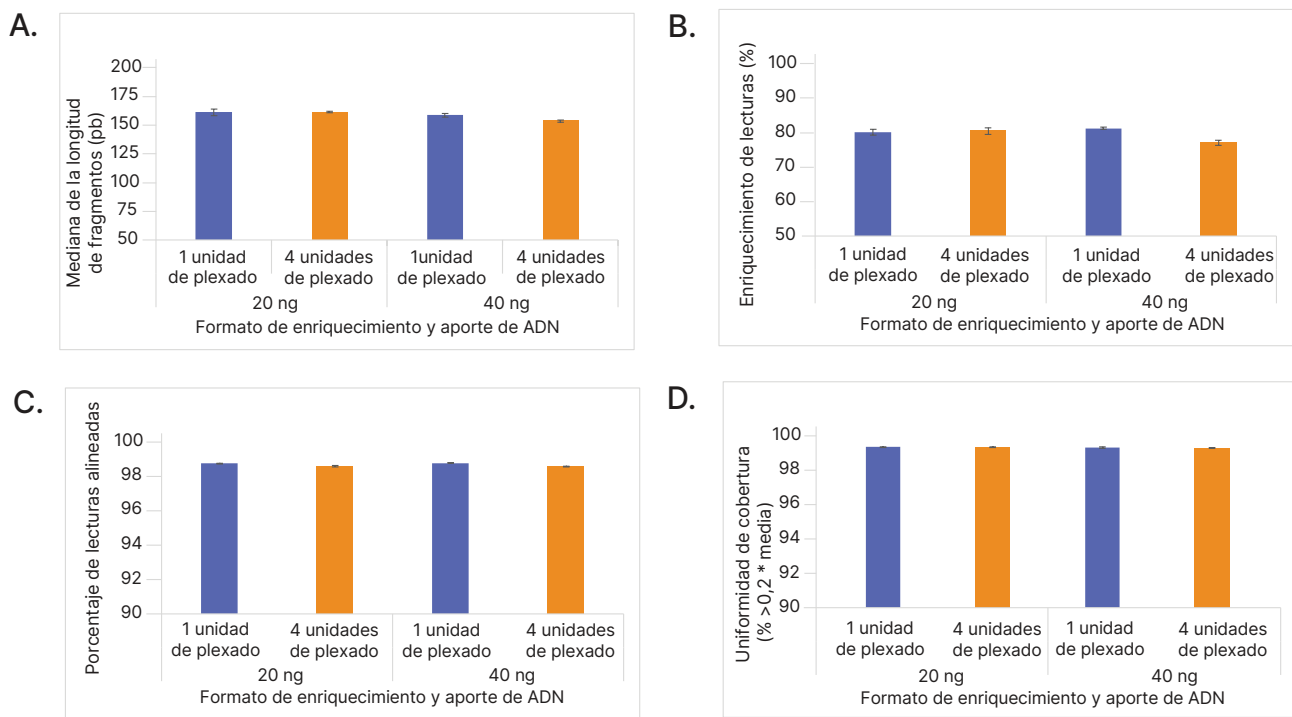


Figura 5: métricas de rendimiento de librerías con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Se prepararon cuatro réplicas de librerías con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment a partir de una línea celular FFPE personalizada portadora de variantes asociadas al cáncer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Las variantes se diluyeron a una frecuencia de alelos objetivo de aproximadamente un 2 %, y las librerías se prepararon con 20 ng o 40 ng de aporte de ADN. El enriquecimiento se realizó con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel siguiendo el flujo de trabajo de enriquecimiento de 1 o 4 unidades de plexado para sondas de ADNbc en la guía del usuario de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Se secuenciaron ocho librerías enriquecidas con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel por carril S4 en NovaSeq 6000 System a 2 × 151 pb. Los datos de secuenciación se submuestrearon en grupos de 200 M (o un total de 400 M de lecturas que pasan el filtro) y se compararon las métricas de rendimiento de la librería entre las dos entradas.

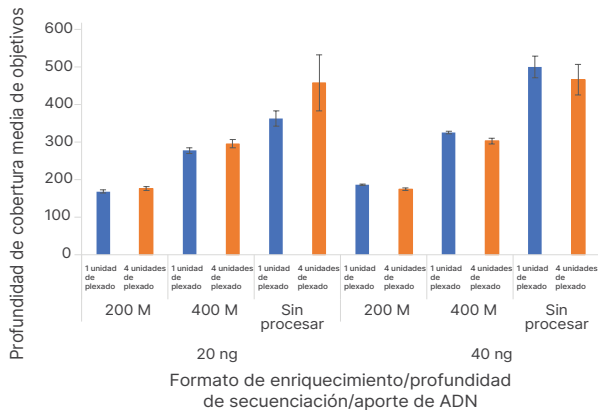
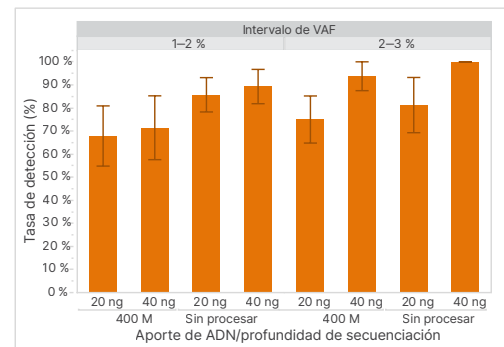


Figura 6: cobertura media de objetivos alcanzada con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Se prepararon cuatro réplicas de librerías con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment a partir de 20 ng o 40 ng de ADN procedente de una línea celular FFPE personalizada portadora de variantes asociadas al cáncer (FFPE TST Custom DNaV2, SeraCare). Las variantes se diluyeron a una frecuencia de alelos objetivo de aproximadamente un 2 %. El enriquecimiento se realizó con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel siguiendo el flujo de trabajo de enriquecimiento de 1 unidad de plexado (barras azules) o 4 unidades de plexado (barras naranjas) para sondas de ADNbc. Se secuenciaron ocho librerías por carril S4 en NovaSeq 6000 System a  $2 \times 151$  pb. Los datos de secuenciación se submuestrearon en grupos de 100 M o 200 M (un total de 200 M o 400 M de lecturas que pasan el filtro) y se evaluaron las métricas de rendimiento de librerías. Las lecturas sin procesar oscilaron entre grupos de 296 M y 417 M (un total de 592 M a 834 M de lecturas que pasan el filtro) para grupos de 1 unidad de plexado, o de 319 M a 544 M (un total de 638 M a 1080 M de lecturas que pasan el filtro) para librerías enriquecidas con 4 unidades de plexado.

Las librerías multiplexadas (4 unidades de plexado) preparadas con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel alcanzaron una sensibilidad del 80 % para SNV entre un 2 y un 3 % de VAF cuando las lecturas de las librerías de 20 ng se submuestrearon en grupos de 200 M. La tasa de detección de SNV mejoró con un aporte de 40 ng o con una secuenciación más profunda, especialmente para variantes dentro del intervalo de VAF del 1 al 2 % (figura 7A). Las librerías multiplexadas preparadas con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel lograron una sensibilidad del 80 al 90 % para indel de entre el 2 y el 3 % de VAF, dependiendo de la cantidad de aporte y la profundidad de secuenciación. Por encima del 3 % de VAF, se detectó el 100 % de indel con cantidades de entrada de 20 ng y 40 ng (figura 7B).

### A. Detección de SNV



### B. Detección de indel

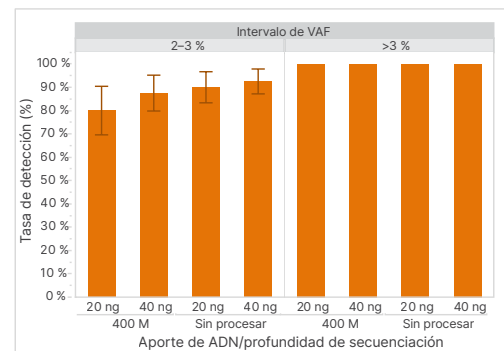


Figura 7: detección de variantes somáticas con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Se prepararon cuatro réplicas de librerías con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment a partir de 20 ng o 40 ng de ADN procedente de una línea celular FFPE personalizada portadora de variantes asociadas al cáncer (FFPE TST Custom DNaV2, SeraCare). Las variantes se diluyeron a una frecuencia de alelos objetivo de aproximadamente un 2 %. El enriquecimiento se realizó con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel siguiendo el flujo de trabajo de enriquecimiento de 4 unidades de plexado para sondas de ADNbc. Se secuenciaron ocho librerías por carril S4 en NovaSeq 6000 System a  $2 \times 151$  pb. Los datos de secuenciación se submuestrearon en grupos de 200 M (un total de 400 M de lecturas que pasan el filtro) y se evaluaron las métricas de rendimiento de librerías. Las lecturas sin procesar oscilaron entre grupos de 319 M y 544 M (un total de 638 M y 1080 M de lecturas que pasan el filtro) para librerías enriquecidas.



## Resumen

La preparación de librerías de alta calidad a partir de ADN FFPE es un factor clave en el rendimiento de la caracterización molecular tumoral basada en NGS. Esta nota de aplicación demuestra el excelente rendimiento de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment en la preparación de librerías listas para secuenciación a partir de ADN extraído de muestras FFPE, lo que produce datos precisos para la llamada de variantes somáticas y análisis sucesivos. Este versátil kit de preparación de librerías es compatible con paneles de enriquecimiento suministrados por el usuario de hasta el tamaño del exoma y proporciona portabilidad de contenido, lo que permite a los laboratorios adaptar su diseño de sus experimentos en función de sus necesidades de investigación.

## Información adicional

[Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

[Aplicación DRAGEN Enrichment](#)

[DRAGEN recipe for analyzing FFPE sample libraries prepared using Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

## Bibliografía

1. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61(1):64-71. doi:10.1373/clinchem.2014.223040



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02524 ESP v1.0