

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx permite una detección de variantes muy precisa

Rendimiento demostrado con muestras de sangre completa y fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, formalin fixed, paraffin-embedded) utilizando paneles de sondas de enriquecimiento de diferentes tamaños



Introducción

ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx es una solución de preparación y enriquecimiento de librerías de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) que cumple con el Reglamento de la Unión Europea (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* y que está regulada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration). Admite una amplia gama de cantidades de entrada de ADN genómico (ADNg) extraído de sangre completa o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE). Cuando se combina con MiSeq™Dx Instrument, NextSeq™ 550Dx Instrument o NovaSeq™ 6000Dx Instrument, ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx permite a los laboratorios clínicos añadir paneles de enriquecimiento de secuenciación selectiva a su oferta de aplicaciones de diagnóstico.

ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx admite paneles fijos y personalizados de distintos tamaños, incluidos los paneles de exoma. El kit es compatible con paneles de oligonucleótidos de ADN de enriquecimiento de ILLUMINA y de terceros para una mayor flexibilidad.

Esta nota técnica demuestra el rendimiento excepcional de ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx en la producción de datos de secuenciación de alta calidad y la detección sensible de variantes germinales y somáticas con control de referencia y muestras de sangre completa y FFPE de la vida real (figura 1). Se utilizaron varios paneles de sondas de enriquecimiento de ILLUMINA y de terceros que cumplen

las especificaciones para la validación con ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx (tabla 1) para la evaluación como prueba de concepto.

Tabla 1: Requisitos del panel de sondas de ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx^a

Parámetro	Especificación
Tipo de sonda	ADN de cadena sencilla o de cadena doble
Longitud de sonda	80 pb o 120 pb
Tamaño de panel	500-675 000 sondas
Entrada de sonda total ^b	≥3 pmol

a. Los paneles que no cumplen estas especificaciones no se han validado y se consideran usos extraoficiales.
b. Para el enriquecimiento con plexicidades de 1 unidad de plexado a 12 unidades de plexado.

Métodos

Muestras y extracción de ADN

Las muestras para la evaluación incluyeron material de referencia NA12878 del Coriell Institute, ADN de referencia comprometido con formol Horizon HD799 y ADN extraído de muestras de sangre completa y tejido FFPE de la vida real. Se puede usar cualquier método de extracción validado. Para obtener más información sobre la preparación de muestras, consulte la [hoja de datos de ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx](#).

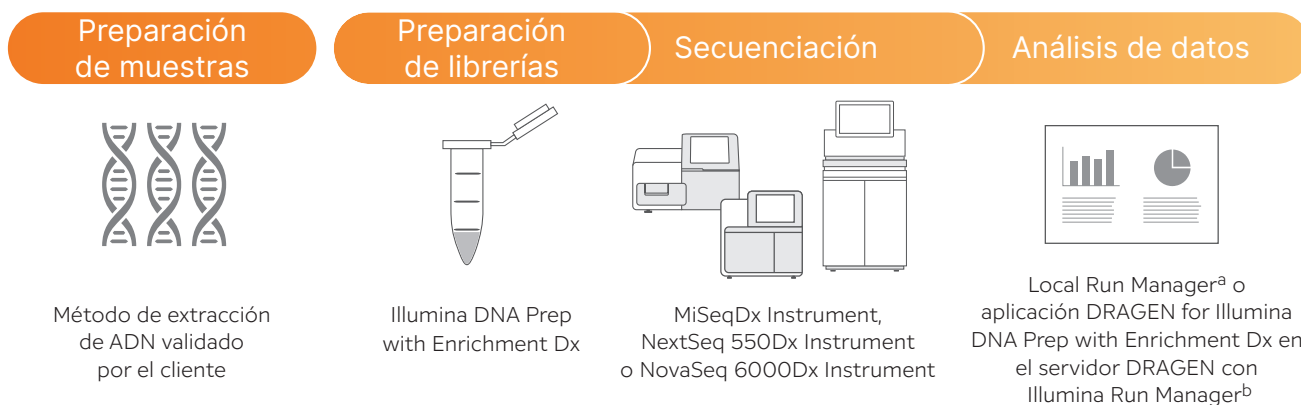


Figura 1: Flujo de trabajo de ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx: el ADN se extrajo siguiendo protocolos estándar. Las librerías se prepararon con ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx y varios paneles de sonda de captura híbrida, seguidos de secuenciación y análisis de datos.

a. MiSeqDx Instrument y NextSeq 550Dx Instrument.

b. Disponible en NextSeq 550Dx Instrument y NovaSeq 6000Dx Instrument.

Tabla 2: Especificaciones del panel de enriquecimiento utilizadas para la evaluación

Función del panel	Exome Panel I	Exome Panel T	Large Panel I	Midsize Panel I	Small Panel I
Tamaño de panel	45,2 Mb	33 Mb	12 Mb	1,94 Mb	255 kb
Tamaño de la sonda	80 pb	120 pb	80 pb	80 pb	80 pb

Tamaño del panel, longitud total de la secuencia en las regiones objetivo; tamaño de la sonda, longitud de la sonda de extracción de enriquecimiento.

Enriquecimiento y preparación de librerías

Se prepararon librerías de todas las muestras utilizando Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Se introdujeron 50 ng o 1000 ng de ADN extraído o el volumen total en la preparación de librerías. La hibridación se llevó a cabo con cinco paneles de enriquecimiento diferentes (tabla 2). Las librerías preparadas a partir de muestras de sangre completa y FFPE se hibridaron como reacciones de enriquecimiento de 12 unidades de plexado y 1 unidad de plexado, respectivamente.

Secuenciación

Las librerías preparadas se secuenciaron en MiSeqDx Instrument o NextSeq 550Dx Instrument con MiSeqDx Reagent Kit v3 o NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), respectivamente, con una longitud de lectura de 2 × 151 pb.

Análisis de datos

Los archivos FASTQ se generaron a partir de llamadas de bases con GenerateFASTQ Dx Module en Local Run Manager. El análisis de los archivos FASTQ se llevó a cabo con scripts personalizados. Se realizaron análisis y visualización de datos adicionales con Microsoft Excel o el software estadístico JMP. La aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx es una [opción para el análisis secundario](#).

Resultados

Para evaluar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, se secuenciaron y analizaron librerías preparadas con diferentes paneles de sondas. El rendimiento se midió empleando diversos criterios de medición de secuenciación, entre los que se incluyen la uniformidad de cobertura, el enriquecimiento de lectura completada y la mediana de la longitud de fragmentos.

Tabla 3: Rendimiento del ensayo con ADN de control en todos los paneles de enriquecimiento

Panel	Cantidad de entrada de ADN (ng)	Enriquecimiento de lectura única completada	Uniformidad de cobertura	Mediana de longitud de fragmento	Recuperación de SNV ^a	Precisión de SNV ^b	Recuperación de indel ^a	Precisión de indel ^b
Exome Panel I	50	78,65	95,37 %	175	96,11 %	98,16 %	89,84 %	84,19 %
	1000	80,81	96,35 %	197	96,47 %	99,60 %	91,10 %	94,05 %
Exome Panel T	50	93,29	97,50 %	178	96,26 %	99,34 %	92,18 %	90,27 %
	1000	92,69	97,78 %	198	96,40 %	99,63 %	91,30 %	96,01 %
Large Panel I	50	82,43	95,78 %	188	97,91 %	98,99 %	89,68 %	83,89 %
	1000	83,91	96,92 %	213	98,13 %	99,82 %	90,70 %	94,66 %
Small Panel I	50	78,34	98,10 %	180	98,54 %	99,88 %	N/D	N/D
	1000	76,86	98,26 %	202	98,54 %	100 %	N/D	N/D

a. Recuperación = verdaderos positivos/(verdaderos positivos + falsos negativos).

b. Precisión = verdaderos positivos/(verdaderos positivos + falsos positivos).

N/P: no procede

La capacidad de llamar con precisión las variantes de nucleótido único (SNV, single-nucleotide variants) y las inserciones/deleciones (indel) se determinó mediante criterios de medición de recuperación y precisión. Para empezar, se usaron 50 ng y 1000 ng de ADN de referencia de NA12878 para preparar librerías con cuatro paneles. Se obtuvieron datos de secuenciación de alta calidad, lo que permitió una llamada precisa de variantes de la línea germinal en todos los paneles incluidos para la evaluación (tabla 3).

Estos resultados demuestran la capacidad de la tagmentación en bolas utilizada por Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para normalizar las muestras con entradas variables con efectos mínimos en la calidad de los datos, lo que permite eliminar los pasos de normalización del protocolo y proporciona un ahorro de tiempo considerable.

Se observaron un enriquecimiento de lecturas completadas y una uniformidad de cobertura elevados con el uso de ADN extraído de muestras de sangre completa, la solución Illumina DNA Prep with Enrichment Dx y tanto Exome Panel I como Small Panel I (tabla 4). Del mismo modo, se observó una alta uniformidad de cobertura con librerías FFPE enriquecidas con Midsize Panel y librerías de HD799 enriquecidas con el mismo panel, lo que permitió una llamada de variantes somáticas de alta precisión (tabla 5).

Tabla 4: Rendimiento con entrada de sangre completa

Panel	Enriquecimiento de lectura única completada	Uniformidad de cobertura	Mediana de longitud de fragmento
Exome Panel I	81,14	95,68 %	203
Small Panel I	77,64	98,13 %	193

Tabla 5: Rendimiento con referencia comprometida con formol y entrada FFPE de la vida real

Panel	Fuente de entrada	Cantidad de entrada (ng)	Uniformidad de cobertura	Recuperación de SNV
Midsize Panel I	FFPE	50	99,24 %	N/D
		1000	99,14 %	N/D
	HD799	50	96,69 %	100 %

Resumen

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ofrece una solución que cumple con el Reglamento UE 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* y regulada por la FDA para métodos de enriquecimiento de secuenciación selectiva, que incluye paneles fijos, paneles personalizados y paneles de exoma. Esta nota técnica demuestra el rendimiento óptimo del ensayo para la secuenciación de enriquecimiento selectivo y la llamada de variantes tanto germinales como somáticas.

Información adicional

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

Declaraciones de uso previsto

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (DIV con marcado CE)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es un conjunto de reactivos y consumibles usados para preparar librerías de muestras a partir de ADN genómico derivado de células y tejidos humanos para desarrollar ensayos de diagnóstico *in vitro*. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sonda proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx incluye software para la configuración, supervisión y análisis de experimentos de secuenciación.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Estados Unidos)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx es un juego de reactivos y consumibles usados para preparar librerías de muestras a partir de ADN extraído de sangre completa periférica y de tejido fijado en formol y embebido en parafina. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sonda proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina.

MiSeqDx Instrument

MiSeqDx Instrument está concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN formadas a partir de ADN genómico humano que se ha extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), en los ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) llevados a cabo en el instrumento. MiSeqDx Instrument no está indicado para la secuenciación del genoma completo o *de novo*. MiSeqDx Instrument debe usarse con un software de análisis y reactivos de DIV registrados y catalogados, autorizados o aprobados.

NextSeq 550Dx Instrument (Estados Unidos)

NextSeq 550Dx Instrument está concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN a partir de ADN genómico humano extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), cuando se usa para ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) que se realizan en el instrumento. NextSeq 550Dx Instrument no está indicado para la secuenciación del genoma completo ni *de novo*. NextSeq 550Dx Instrument se debe usar con un software de análisis y reactivos de DIV registrados y catalogados, autorizados o aprobados.

NextSeq 550Dx Instrument (Unión Europea/otros)

NextSeq 550Dx Instrument está concebido para la secuenciación de librerías de ADN cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) que se realizan en el instrumento. NextSeq550 Dx Instrument se debe usar con un software de análisis y reactivos de DIV específicos registrados, certificados o aprobados.

NovaSeq 6000Dx Instrument (Estados Unidos)

NovaSeq 6000Dx Instrument está concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN a partir de ADN genómico humano extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV). NovaSeq 6000Dx Instrument no está indicado para la secuenciación del genoma completo o *de novo*. NovaSeq 6000Dx Instrument está concebido para usarse con un software de análisis y reactivos de DIV específicos registrados, certificados o aprobados.

NovaSeq 6000Dx Instrument (Unión Europea/otros)

NovaSeq 6000Dx Instrument está concebido para la secuenciación de librerías de ADN, cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV). NovaSeq 6000Dx Instrument está concebido para usarse con un software de análisis y reactivos de DIV específicos registrados, certificados o aprobados.



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

© 2023 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.
M-GL-00744 ESP v3.0