

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx consente il rilevamento altamente accurato delle varianti

Prestazioni dimostrate con
campioni di sangue intero
ed FFPE utilizzando pannelli
sonda di arricchimento
di diverse dimensioni

illumina[®]

Introduzione

ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx è una soluzione di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) per la preparazione di librerie e l'arricchimento regolamentata dalla Food and Drug Administration (FDA) e conforme al regolamento relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro* (IVDR, *In Vitro* Diagnostics Regulation) 2017/746 dell'Unione europea (UE). Supporta svariate quantità di input di DNA genomico (gDNA, genomic DNA) estratto da sangue intero o da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded). Combinato con MiSeq™ Dx Instrument, NextSeq™ 550Dx Instrument o NovaSeq™ 6000Dx Instrument, ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx consente ai laboratori clinici di aggiungere i pannelli di arricchimento per il sequenziamento mirato alla suite di applicazioni diagnostiche.

ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx è compatibile con pannelli di diverse dimensioni, sia fissi sia personalizzati, compresi i pannelli esomici. Grazie alla flessibilità avanzata, il kit è compatibile con i pannelli di oligonucleotidi sonde di arricchimento del DNA di ILLUMINA e di terze parti.

Questa nota tecnica dimostra le eccezionali prestazioni di ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx nella produzione di dati di sequenziamento di alta qualità e nel rilevamento sensibile di varianti della linea germinale e somatiche con controllo di riferimento e campioni di sangue intero ed FFPE reali (Figura 1).

Per la valutazione come prova di principio sono stati utilizzati vari pannelli sonda di arricchimento ILLUMINA e di terze parti che soddisfano le specifiche per la convalida con ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx (Tabella 1).

Tabella 1: requisiti dei pannelli sonda ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx^a

| Parametro | Specifica |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Tipo di sonda | DNA a filamento singolo o doppio |
| Lunghezza sonda | 80 bp o 120 bp |
| Dimensione pannello | 500-675.000 sonde |
| Input totale della sonda ^b | ≥3 pmol |

a. I pannelli al di fuori di queste specifiche non sono stati convalidati e sono considerati per uso off-label.
b. Per l'arricchimento da 1 a 12 plex.

Metodi

Campioni ed estrazione del DNA

I campioni per la valutazione includevano il materiale di riferimento NA12878 del Coriell Institute, il DNA di riferimento compromesso con formalina Horizon HD799 e il DNA estratto da campioni di sangue intero e tessuto FFPE reali. È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione convalidato. Per ulteriori informazioni sulla preparazione dei campioni, consultare la [scheda tecnica di ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx](#).



Figura 1: flusso di lavoro di ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx. Il DNA è stato estratto seguendo i protocolli standard. Le librerie sono state preparate utilizzando ILLUMINA DNA Prep with Enrichment Dx e diversi pannelli sonda di ibridazione-cattura, per poi procedere con il sequenziamento e l'analisi dei dati.

a. Disponibile su MiSeqDx Instrument.

b. Disponibile su NextSeq 550Dx Instrument e NovaSeq 6000Dx Instrument.

Tabella 2: specifiche del pannello di arricchimento utilizzate per la valutazione

| Funzione pannello | Exome panel I | Exome panel T | Large panel I | Midsized panel I | Small panel I |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------|
| Dimensione pannello | 45,2 Mb | 33 Mb | 12 Mb | 1,94 Mb | 255 kb |
| Dimensione sonda | 80 bp | 120 bp | 80 bp | 80 bp | 80 bp |

Dimensione del pannello = lunghezza totale della sequenza nelle regioni target; dimensione della sonda = lunghezza della sonda di pulldown di arricchimento.

Preparazione delle librerie e arricchimento

Le librerie sono state preparate per tutti i campioni utilizzando Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Nella preparazione delle librerie sono stati inseriti 50 ng, 1.000 ng o il volume totale di DNA estratto. L'ibridazione è stata eseguita con cinque diversi pannelli di arricchimento (Tabella 2). Le librerie preparate da campioni di sangue intero ed FFPE sono state ibridate rispettivamente come reazioni di arricchimento da 12 plex e da 1 plex.

Sequenziamento

Le librerie preparate sono state sequenziate su MiSeqDx Instrument o NextSeq 550Dx Instrument utilizzando rispettivamente MiSeqDx Reagent Kit v3 o NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), a una lunghezza di lettura di 2 × 151 bp.

Analisi dei dati

I file FASTQ sono stati generati dalle identificazioni delle basi utilizzando il modulo GenerateFASTQ Dx in Local Run Manager. L'analisi dei file FASTQ è stata eseguita con script personalizzati. Ulteriori analisi e visualizzazione dei dati sono state eseguite utilizzando il software statistico Microsoft Excel o JMP. L'app DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è un'opzione per l'analisi secondaria.

Tabella 3: prestazioni del saggio con DNA di controllo sui pannelli di arricchimento

| Pannello | Quantità di input di DNA (ng) | Arricchimento di letture "padded" uniche | Uniformità di copertura | Lunghezza mediana frammento | Richiamo SNV ^a | Precisione SNV ^b | Richiamo indel ^a | Precisione indel ^b |
|---------------|-------------------------------|--|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Exome 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% |
| Exome 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% |
| Large 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% |
| Small panel I | 50 | 78,34 | 98,10% | 180 | 98,54% | 99,88% | N/A | N/A |
| | 1.000 | 76,86 | 98,26% | 202 | 98,54% | 100% | N/A | N/A |

a. Richiamo = veri positivi/(veri positivi + falsi negativi).

b. Precisione = veri positivi/(veri positivi + falsi positivi).

N/A: non applicabile

Risultati

Per valutare Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, sono state sequenziate e analizzate le librerie preparate con diversi pannelli sonda. Le prestazioni sono state misurate mediante varie metriche di sequenziamento, tra cui uniformità della copertura, arricchimento di letture "padded" e mediana della lunghezza dei frammenti. La capacità di identificare accuratamente le varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) e le inserzioni/delezioni (indel) è stata determinata mediante richiamo e metriche di precisione. Per iniziare, sono stati utilizzati 50 ng e 1.000 ng di DNA di riferimento NA12878 per preparare librerie con quattro pannelli.

Sono stati ottenuti dati di sequenziamento di alta qualità che hanno permesso l'identificazione accurata delle varianti della linea germinale su tutti i pannelli inclusi per la valutazione (Tabella 3). Questi risultati dimostrano la capacità della tagmentazione su microsferi utilizzata da Illumina DNA Prep with Enrichment Dx di normalizzare i campioni con input variabili con effetti minimi sulla qualità dei dati, consentendo la rimozione delle fasi di normalizzazione dal protocollo per un notevole risparmio di tempo.

Quando sono stati utilizzati il DNA estratto da campioni di sangue intero, la soluzione Illumina DNA Prep with Enrichment Dx e sia Exome panel I sia Small panel I, sono stati osservati un elevato arricchimento di letture "padded" e l'uniformità della copertura (Tabella 4). Analogamente, è stata osservata un'elevata uniformità di copertura con le librerie FFPE arricchite con Midsized panel e le librerie HD799 arricchite con lo stesso pannello, il che ha permesso l'identificazione altamente accurata delle varianti somatiche (Tabella 5).

Tabella 4: prestazioni con input di sangue intero

| Pannello | Arricchimento di letture "padded" uniche | Uniformità di copertura | Lunghezza mediana frammento |
|---------------|--|-------------------------|-----------------------------|
| Exome panel I | 81,14 | 95,68% | 203 |
| Small panel I | 77,64 | 98,13% | 193 |

Tabella 5: prestazioni con riferimento compromesso con formalina e input FFPE reali

| Pannello | Sorgente di input | Quantità di input (ng) | Uniformità di copertura | Richiamo SNV |
|------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|--------------|
| Midsized panel I | FFPE | 50 | 99,24% | N/A |
| | | 1.000 | 99,14% | N/A |
| | HD799 | 50 | 96,69% | 100% |

Riepilogo

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è una soluzione inclusiva di pannelli fissi, pannelli personalizzati e pannelli esomici, regolamentata dall'FDA e conforme al regolamento IVDR 2017/746 dell'UE, concepita per i metodi di arricchimento finalizzati al sequenziamento mirato. Questa nota tecnica dimostra le prestazioni ottimali del saggio per il sequenziamento di arricchimento mirato e l'identificazione delle varianti sia della linea germinale sia somatiche.

Maggiori informazioni

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

Dichiarazioni di uso previsto

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (CE-IVD)

Il kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è un set di reagenti e materiali di consumo utilizzato per preparare le librerie di campioni ottenute da DNA genomico proveniente da cellule e tessuti umani per sviluppare saggi diagnostici *in vitro*. Per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico è necessario l'uso di pannelli sonda forniti dall'utente. Le librerie di campioni ottenute sono destinate all'uso sui sistemi di sequenziamento di Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx include un software per la configurazione, il monitoraggio e l'analisi della corsa di sequenziamento.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Stati Uniti)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è un set di reagenti e materiali di consumo per preparare le librerie di campioni ottenute da DNA estratto da sangue intero periferico e tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico è necessario l'uso di pannelli sonda forniti dall'utente. Le librerie di campioni ottenute sono destinate all'uso sui sistemi di sequenziamento di Illumina.

MiSeqDx Instrument

MiSeqDx Instrument è destinato al 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 per diagnostica *in vitro* (IVD, *In Vitro* Diagnostics) eseguiti sullo strumento. MiSeqDx Instrument non è destinato al sequenziamento dell'intero genoma né al sequenziamento *de novo*. MiSeqDx Instrument va utilizzato con software analitici e reagenti per IVD registrati e certificati, autorizzati o approvati.

NextSeq 550Dx Instrument (Stati Uniti)

NextSeq 550Dx Instrument è destinato al 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 per diagnostica *in vitro* (IVD) eseguiti sullo strumento. NextSeq 550Dx Instrument non è destinato al sequenziamento dell'intero genoma né al sequenziamento *de novo*. NextSeq 550Dx Instrument deve essere utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati ed elencati, autorizzati o approvati.

NextSeq 550Dx Instrument (Unione europea/ altri territori)

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

NovaSeq 6000Dx Instrument (Stati Uniti)

NovaSeq 6000Dx Instrument è destinato al 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 per diagnostica *in vitro* (IVD). NovaSeq 6000Dx Instrument non è destinato al sequenziamento dell'intero genoma né al sequenziamento *de novo*. NovaSeq 6000Dx Instrument va utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati, certificati o approvati.

NovaSeq 6000Dx Instrument (Unione europea/ altri territori)

NovaSeq 6000Dx Instrument è destinato al sequenziamento di librerie di DNA quando utilizzato con saggi per diagnostica *in vitro* (IVD). NovaSeq 6000Dx Instrument va utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati, certificati o approvati.



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

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00744 ITA v4.0