

# O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx permite a detecção de variantes com alta precisão

Desempenho demonstrado  
com amostras de sangue total  
e FFPE através de painéis  
de sonda de enriquecimento  
de tamanhos variados

**illumina**<sup>®</sup>

## Introdução

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx é uma solução de sequenciamento de última geração (NGS) de preparação e enriquecimento de bibliotecas que está em conformidade com o Regulamento de Diagnósticos *In Vitro* (IVDR) da União Europeia (UE) 2017/746 e é regulamentado pela Food and Drug Administration (FDA). Essa solução oferece suporte a uma ampla variedade de quantidades de entrada de DNA genômico (gDNA) extraídas de sangue total ou de tecido fixado em formalina e embocado em parafina (FFPE). Quando combinada com instrumentos MiSeq™ Dx, NextSeq™ 550Dx ou NovaSeq™ 6000Dx, o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx permite que os laboratórios clínicos adicionem painéis de enriquecimento de sequenciamento direcionados ao menu de aplicações de diagnóstico.

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx é compatível com painéis fixos e personalizados de tamanhos variados, incluindo painéis de exoma. O kit é compatível com painéis oligonucleotídeos de DNA de enriquecimento da Illumina e de terceiros, proporcionando mais flexibilidade.

Esta nota técnica demonstra o desempenho excepcional do Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na produção de dados de sequenciamento de alta qualidade e detecção sensível de variantes de linha genética e somática com controle de referência e amostras reais de sangue total e FFPE (Figura 1). Vários painéis de sondas de enriquecimento da Illumina e de terceiros

que atendem às especificações de validação com o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Tabela 1) foram usados para avaliação como prova de princípio.

Tabela 1: Requisitos do painel de sonda do Illumina DNA Prep with Enrichment Dx<sup>a</sup>

Parâmetro	Especificação
Tipo de sonda	DNA de fita única ou dupla
Comprimento da sonda	80 bp ou 120 bp
Tamanho do painel	500 a 675.000 sondas
Entrada total da sonda <sup>b</sup>	≥ 3 pmols

a. Os painéis que estão fora dessas especificações não foram validados e são considerados como uso fora da indicação.

b. Para enriquecimento em plexidades de 1-plex a 12-plex.

## Métodos

### Extração de amostras e DNA

As amostras para avaliação incluíram o material de referência NA12878 do Coriell Institute, o DNA de referência tratado com formalina Horizon HD799 e o DNA extraído de amostras reais de sangue total e tecido FFPE. Qualquer método de extração validado pode ser usado. Consulte a [planilha de dados do Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#) para saber mais sobre a preparação de amostras.



Figura 1: fluxo de trabalho Illumina DNA Prep with Enrichment Dx: o DNA foi extraído conforme os protocolos padrão. As bibliotecas foram preparadas com o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx e vários painéis de sonda de captura híbrida, seguidos por sequenciamento e análise de dados.

a. Disponível no MiSeqDx Instrument.

b. Disponível nos instrumentos NextSeq 550Dx e NovaSeq 6000Dx.

Tabela 2: Especificações do painel de enriquecimento usadas para avaliação

Recurso do painel	Painel do exoma I	Painel do exoma T	Painel grande I	Painel médio I	Painel pequeno I
Tamanho do painel	45,2 Mb	33 Mb	12 Mb	1,94 Mb	255 kb
Tamanho da sonda	80 bp	120 bp	80 bp	80 bp	80 bp

Tamanho do painel, comprimento total do sequenciamento nas regiões-alvo; tamanho da sonda, comprimento da sonda de pulldown para enriquecimento.

## Preparação e enriquecimento da biblioteca

As bibliotecas foram preparadas para todas as amostras mediante o uso do Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. 50 ng ou 1.000 ng de DNA extraído ou o volume total foi inserido na preparação da biblioteca. A hibridização foi realizada com cinco painéis de enriquecimento diferentes (Tabela 2). As bibliotecas preparadas a partir de amostras de sangue total e FFPE foram hibridizadas como reações de enriquecimento de 12-plex e 1-plex, respectivamente.

## Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no instrumento MiSeqDx ou NextSeq 550Dx usando o MiSeqDx Reagent Kit v3 ou o NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), respectivamente, com comprimento da leitura de 2x151 bp.

## Análise de dados

Os arquivos FASTQ foram gerados a partir de identificações de bases que utilizam o módulo GenerateFASTQ Dx no Local Run Manager. A análise dos arquivos FASTQ foi realizada com scripts personalizados. A análise e a visualização adicionais dos dados foram realizadas através do software estatístico Microsoft Excel ou JMP. A aplicação do DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx é uma [opção para análise secundária](#).

Tabela 3: Desempenho do ensaio com DNA de controle em painéis de enriquecimento

Painel	Quantidade de entrada de DNA (ng)	Enriquecimento de leitura padded exclusivo	Uniformidade de cobertura	Mediana do comprimento do fragmento	Recall de SNV <sup>a</sup>	Precisão da SNV <sup>b</sup>	Recall de indel <sup>a</sup>	Precisão de indel <sup>b</sup>
Painel do exoma 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%
Painel do exoma 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%
Painel grande 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%
Painel pequeno 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. Recall = verdadeiros positivos/(verdadeiros positivos + falsos negativos).

b. Precisão = verdadeiros positivos/(verdadeiros positivos + falsos positivos).

N/A, não aplicável

## Resultados

Para avaliar o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, bibliotecas preparadas com diferentes painéis de sonda foram sequenciadas e analisadas. O desempenho foi medido através de várias métricas de sequenciamento, incluindo uniformidade de cobertura, enriquecimento de leitura padded e mediana do comprimento do fragmento. A capacidade de identificar variantes de nucleotídeos únicos (SNV) e inserções/deleções (indels) com precisão foi determinada por métricas de recall e precisão. Para começar, 50 ng e 1.000 ng de DNA de referência NA12878 foram usados para preparar bibliotecas com quatro painéis. Foram obtidos dados de sequenciamento de alta qualidade, permitindo a identificação precisa de variantes da linha genética em todos os painéis incluídos na avaliação (Tabela 3).

Esses resultados demonstram a capacidade da tagmentação em bead usada pelo Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para normalizar amostras com entradas variadas e efeitos mínimos na qualidade dos dados, permitindo a remoção das etapas de normalização do protocolo para economia substancial de tempo.

Foram observados um alto enriquecimento de leitura e uma uniformidade de cobertura padded ao usar DNA extraído de amostras de sangue total, bem como a solução Illumina DNA Prep with Enrichment Dx e o painel do Exoma I e painel pequeno I (Tabela 4). Da mesma forma, foi observada alta uniformidade de cobertura com bibliotecas FFPE enriquecidas com painel médio e bibliotecas HD799 enriquecidas com o mesmo painel, permitindo a identificação de alta precisão de variantes somáticas (Tabela 5).

Tabela 4: Desempenho com entrada de sangue total

Painel	Enriquecimento de leitura padded exclusivo	Uniformidade de cobertura	Mediana do comprimento do fragmento
Painel do exoma I	81,14	95,68%	203
Painel pequeno I	77,64	98,13%	193

Tabela 5: Desempenho com referência tratada com formalina e entrada real de FFPE

Painel	Fonte de entrada	Quantidade de entrada (ng)	Uniformidade de cobertura	Recall de SNV
Painel médio I	FFPE	50	99,24%	N/A
		1.000	99,14%	N/A
	HD799	50	96,69%	100%

## Resumo

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx fornece uma solução regulada pela FDA e pelo regulamento IVDR 2017/746 da UE para métodos direcionados de enriquecimento do sequenciamento, incluindo painéis fixos, personalizados e painéis do exoma. Esta nota técnica demonstra o desempenho ideal do ensaio para o sequenciamento de enriquecimento direcionado e a identificação de variantes somáticas e da linha genética.

## Saiba mais

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

## Declarações de uso pretendido

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (CE-IVD)

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit é um conjunto de reagentes e materiais de consumo usados para preparar bibliotecas de amostras com base em DNA genômico derivado de células e tecidos humanos para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico *in vitro*. Os painéis de sondas fornecidos pelo usuário são necessários para a preparação de bibliotecas direcionadas a regiões genômicas específicas de interesse. As bibliotecas de amostras geradas destinam-se ao uso em sistemas de sequenciamento da Illumina. O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx inclui software para configuração, monitoramento e análise da corrida de sequenciamento.

### Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Estados Unidos)

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx é um conjunto de reagentes e materiais de consumo usados para preparar bibliotecas de amostras com base em DNA extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e embocado em parafina. Os painéis de sondas fornecidos pelo usuário são necessários para a preparação de bibliotecas direcionadas a regiões genômicas específicas de interesse. As bibliotecas de amostras geradas destinam-se ao uso em sistemas de sequenciamento da Illumina.

### MiSeqDx Instrument

O MiSeqDx Instrument destina-se ao sequenciamento direcionado de bibliotecas de DNA baseado em DNA genômico humano extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e embocado em parafina (FFPE), quando usado em ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD) no instrumento. O MiSeqDx Instrument não se destina aos sequenciamentos do genoma completo ou *de novo*. O MiSeqDx Instrument deve ser usado com reagentes de IVD e softwares analíticos registrados e listados, liberados ou aprovados.

### NextSeq 550Dx Instrument (Estados Unidos)

O NextSeq 550Dx Instrument destina-se ao sequenciamento direcionado de bibliotecas de DNA baseado em DNA genômico humano extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e embocado em parafina (FFPE) quando usado em ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD) no instrumento. O NextSeq 550Dx Instrument não se destina ao sequenciamento do genoma completo ou *de novo*. O NextSeq 550Dx Instrument deve ser usado com reagentes de IVD e softwares analíticos registrados e listados, autorizados ou aprovados.

### NextSeq 550Dx Instrument (União Europeia/outro)

O NextSeq 550Dx Instrument destina-se ao sequenciamento de bibliotecas de DNA quando usado com ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD) realizados no instrumento. O NextSeq 550Dx Instrument deve ser usado com reagentes de IVD e software analítico específicos registrados, certificados ou aprovados.

### NovaSeq 6000Dx Instrument (Estados Unidos)

O NovaSeq 6000Dx Instrument destina-se ao sequenciamento direcionado de bibliotecas de DNA baseado em DNA genômico humano extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e embocado em parafina (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded) quando usado com ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD). O NovaSeq 6000Dx Instrument não se destina ao sequenciamento *de novo* ou do genoma completo. O NovaSeq 6000Dx Instrument destina-se ao uso com reagentes de IVD específicos e software analítico registrados, certificados ou aprovados.

### NovaSeq 6000Dx Instrument (União Europeia/outro)

O NovaSeq 6000Dx Instrument destina-se ao sequenciamento de bibliotecas de DNA quando usado com ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD). O NovaSeq 6000Dx Instrument destina-se ao uso com reagentes de IVD específicos e software analítico registrados, certificados ou aprovados.



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00744 PTB v4.0