

# TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx

Un kit, regolamentato dall'FDA e dotato di marcatura CE-IVD, che consente ai laboratori clinici di progettare saggi personalizzati per gli strumenti di sequenziamento MiSeq™Dx e NextSeq™ 550Dx.

## Punti principali

- **Progettazione del saggio flessibile**  
Sviluppato per andare incontro alle esigenze specifiche dell'utente
- **Kit convalidati**  
Specifiche delle prestazioni convalidate quando utilizzato con gli strumenti e i reagenti di sequenziamento Illumina
- **Compatibile con diversi tipi di campione**  
Preparazione delle librerie ottimizzata per il DNA estratto da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) o campioni di sangue intero
- **Riproducibilità elevata del saggio**  
Risultati coerenti tra operatori e sistemi multipli



**Figura 1: TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:** TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, regolamentato dall'FDA e marcato CE-IVD, fornisce i reagenti per la preparazione delle librerie che consentono ai laboratori di sviluppare i propri test diagnostici da utilizzare sugli strumenti di sequenziamento Dx Illumina.

## Introduzione

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (Figura 1) è un kit per il sequenziamento di ampliconi, regolamentato dalla Food and Drug Administration (FDA) e dotato di marcatura Conformité Européenne per diagnostica *in vitro* (CE-IVD), che consente ai laboratori clinici di sviluppare saggi personalizzati per il sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS). Questi saggi personalizzati possono essere utilizzati con gli strumenti MiSeqDx e NextSeq 550Dx che sono regolamentati dall'FDA e dotati di marcatura CE-IVD. Quando utilizzati assieme, TruSeq Custom Amplicon Kit Dx e gli strumenti di sequenziamento Dx Illumina forniscono una soluzione completa dal DNA ai dati con l'accuratezza e l'affidabilità necessarie in un ambiente regolamentato. Grazie all'efficienza della tecnologia NGS, i laboratori clinici sono in grado di offrire ai propri clienti diverse applicazioni diagnostiche in continua crescita.

## Soluzione convalidata per la preparazione delle librerie

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx offre una soluzione convalidata per la preparazione delle librerie che include reagenti di elevata qualità e un flusso di lavoro ottimizzato. La convalida dei reagenti per la preparazione delle librerie assicura prestazioni coerenti da un lotto all'altro e permette di utilizzare a lungo termine i saggi progettati e di gestire facilmente le modifiche. L'utilizzo di reagenti convalidati consente di risparmiare preziose risorse di laboratorio per la riconvalida di reagenti o saggi da utilizzare in futuro. Il flusso di lavoro è efficiente e veloce e richiede appena 50 ng di DNA genomico (Genomic DNA, gDNA) o 10 µl di DNA in FFPE qualificato per generare librerie di sequenziamento in meno di due giorni.

## Progettazione del saggio personalizzata

Grazie a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, i laboratori clinici sviluppano i saggi utilizzando sonde per la cattura di oligonucleotidi progettate dal cliente. Tale personalizzazione offre agli utenti la flessibilità di interrogare determinate regioni di interesse. Le specifiche dei target (Tabella 1) supportano il sequenziamento superiore al 90% di esoni in RefSeq,<sup>1</sup> in base alla progettazione del saggio. La possibilità di personalizzare la configurazione del kit offre inoltre la flessibilità per il rendimento dei campioni.

**Tabella 1: Capacità di rilevamento di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx**

| Parametro                             | Germline | Somatic                          |
|---------------------------------------|----------|----------------------------------|
| <b>Contesto genomico</b>              |          |                                  |
| Contenuto in GC                       | 19-78%   | 19-73% <sup>a</sup>              |
| Lunghezza PolyA                       | ≤ 8      | ≤ 8                              |
| Lunghezza PolyT                       | ≤ 10     | ≤ 10                             |
| Lunghezza PolyG                       | ≤ 7      | ≤ 6                              |
| Lunghezza PolyC                       | ≤ 6      | ≤ 6                              |
| Lunghezza di regioni dinucleotidiche  | ≤ 11x    | ≤ 4x                             |
| Lunghezza di regioni trinucleotidiche | ≤ 5x     | ≤ 5x                             |
| <b>Varianti</b>                       |          |                                  |
| Polimorfismi di singolo nucleotide    | Si       | Si, 5% del limite di rilevamento |
| Lunghezza inserzione                  | ≤ 24 bp  | ≤ 24 bp                          |
| Lunghezza delezione                   | ≤ 25 bp  | ≤ 25 bp                          |

a. Fino al 78% con lo strumento NextSeq 550Dx.

## Flusso di lavoro di preparazione delle librerie

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx produce librerie pronte per il sequenziamento che possono essere caricate su uno strumento di sequenziamento Dx Illumina per la generazione di dati di sequenziamento affidabili in meno di due giorni.



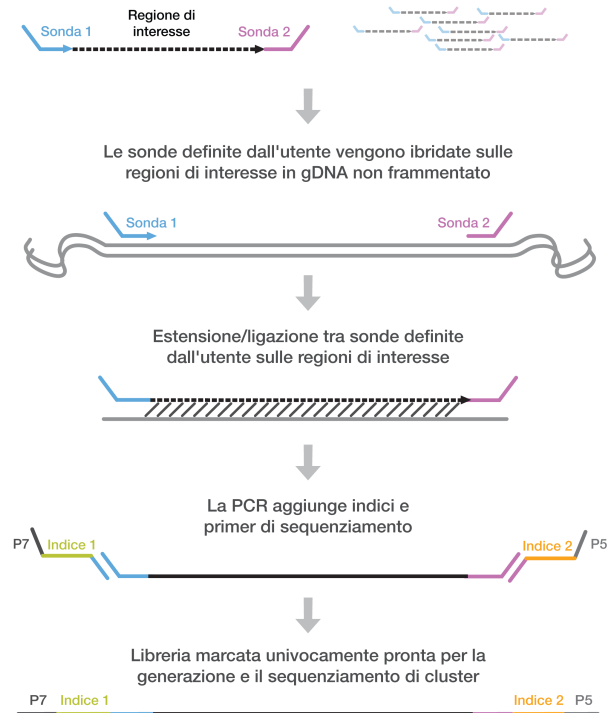
**Figura 2: Flusso di lavoro ottimizzato per il saggio personalizzato:** il flusso di lavoro di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx fornisce i dati dal DNA grazie a una procedura ottimizzata in sei fasi.

### Flusso di lavoro ottimizzato

Il flusso di lavoro di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx include sei fasi principali (Figura 2). Le sonde per la cattura di oligonucleotidi che mirano alle regioni di interesse vengono miscelate con il campione di DNA durante la preparazione delle librerie. Le librerie vengono raggruppate in pool e quindi sequenziate su uno strumento di sequenziamento Dx Illumina. I dati vengono raccolti in tempo reale e analizzati mediante il software Local Run Manager.

### Input di gDNA o DNA in FFPE

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx è ottimizzato per l'uso con 50 ng di gDNA o 10 µl di DNA derivato da tessuto in FFPE qualificato. 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.



**Figura 3: Chimica di preparazione delle librerie di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:** TruSeq Custom Amplicon Kit Dx utilizza sonde progettate dal cliente per catturare e sequenziare determinati target di interesse.

### Chimica del saggio

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx assieme alla comprovata chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) consente la cattura e il sequenziamento delle sole regioni di interesse (Figura 3). Il campione di gDNA o di DNA in FFPE viene miscelato con un raggruppamento in pool di sonde per la cattura di oligonucleotidi definite dall'utente. Ciascuna sonda include sequenze progettate per catturare le regioni di interesse e una sequenza adattatore utilizzata in una successiva reazione di amplificazione. Le sonde sottopongono a ibridazione il DNA, una upstream e una downstream della sequenza di DNA target. Una reazione estensione-ligazione di proprietà esegue un'estensione sulla regione di interesse, seguita da una ligazione, per unire le due sonde. Questo consente di creare un filamento templato e fornisce eccellente specificità del saggio.

Per consentire l'analisi simultanea di più campioni in una singola corsa di sequenziamento (multiplex), le singole librerie sono "marcate" con un identificatore univoco o un indice. Questi indici univoci e specifici per il campione vengono aggiunti durante la fase di amplificazione mediante PCR nel protocollo di preparazione delle librerie. Il prodotto finale include le regioni definite dall'utente, gli adattatori e gli indici necessari per il sequenziamento su uno strumento di sequenziamento Dx Illumina.

Tabella 2: Lo studio delle identificazioni delle varianti mostra l'elevata riproducibilità del saggio<sup>2</sup>

| Analisi                                 | Metrica | Tipo di variante | MiSeqDx (8 corse) | NextSeq 550Dx (9 corse) |
|---|---------|------------------|-------------------|-------------------------|
| Identificazioni delle varianti Germline | PPA     | SNV              | 99,8%             | > 99,9%                 |
|   | PPA     | Inserzione       | 98,1%             | 98,9%                   |
|   | PPA     | Delezione        | 99,8%             | 100%                    |
|   | NPA     |                  | 100%              | 100%                    |
| Identificazioni delle varianti Somatic  | PPA     | SNV              | 100%              | 99,9%                   |
|   | PPA     | Inserzione       | 100%              | 99,9%                   |
|   | PPA     | Delezione        | 100%              | 99,9%                   |
|   | NPA     |                  | > 99,9%           | > 99,9%                 |

Le percentuali rappresentano il valore più basso sulle corse. Abbreviazioni: concordanza positiva espressa in percentuale (Positive Percent Agreement, PPA), concordanza negativa espressa in percentuale (Negative Percent Agreement, NPA), variante di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV).

### Tecnologia NGS ampiamente adottata

La chimica SBS Illumina è la tecnologia NGS più ampiamente adottata nel campo del sequenziamento.<sup>3</sup> Grazie al sequenziamento massivo in parallelo utilizzando un metodo basato su terminatori reversibili di proprietà, le singole basi sono rilevate mentre vengono incorporate in filamenti di DNA in crescita. Viene eseguito l'imaging di un terminatore marcato per fluorescenza a mano a mano che viene aggiunto e scisso ogni dNTP (dATP, dCTP, dGTP o dTTP) per consentire l'incorporazione della base successiva. Poiché durante ogni ciclo di sequenziamento sono presenti tutti e quattro i dNTP legati ai terminatori reversibili, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Il risultato è un sequenziamento base per base che consente di ottenere la cattura di dati altamente accurati.<sup>4</sup>

### Dati altamente riproducibili

Per dimostrare l'elevata riproducibilità dei dati ottenuti mediante TruSeq Custom Amplicon Kit Dx e la chimica SBS, sono stati eseguiti diversi studi sulla precisione dell'identificazione delle varianti con un saggio rappresentativo. Lo studio consisteva di più operatori, strumenti e lotti su 8-9 corse (Tabella 2).

### Riepilogo

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx offre una soluzione regolamentata dall'FDA per la progettazione di saggi NGS che interrogano regioni di interesse genomico definite dall'utente. Il kit consente ai laboratori clinici di sfruttare la velocità e l'accuratezza della tecnologia NGS e di fornire ai propri clienti una gamma di servizi in continua crescita.

### Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, visitate la pagina Web [www.illumina.com/TSCAKitDx](http://www.illumina.com/TSCAKitDx)

Per maggiori informazioni sullo strumento MiSeqDx, visitate la pagina Web [www.illumina.com/MiSeqDx](http://www.illumina.com/MiSeqDx).

Per maggiori informazioni sullo strumento NextSeq 550Dx, visitate la pagina Web [www.illumina.com/nextseq550dx](http://www.illumina.com/nextseq550dx).

### Informazioni per gli ordini

| Prodotto  | N. di catalogo |
|---|----------------|
| TruSeq Custom Amplicon Kit Dx <sup>a</sup>                        | 20005718       |
| TruSeq Custom Amplicon Dx-FFPE QC Kit <sup>a</sup>                | 20006259       |
| Strumento MiSeqDx   | DX-410-1001    |
| MiSeqDx Reagent Kit v3 <sup>a</sup>                               | 20012552       |
| Strumento NextSeq 550Dx   | 20005715       |
| NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2 (300 cicli) <sup>a</sup> | 20019554       |
| TruSeq Index Plate Fixture Kit                                    | DX-130-1005    |
| Kit TruSeq Index Plate Fixture e Collar                           | DX-130-1007    |

a. I materiali di consumo di Classe I sono spediti in singolo lotto, lotti di kit per l'analisi, dispongono di notifica preventiva di modifica e 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. Database delle sequenze di riferimento NCBI (RefSeq). [www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/). Consultato il 10 ottobre 2017.
2. Dati in archivio. Illumina, Inc. 2017.
3. Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc. 2015.
4. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature. 2008;456\(7218\):53-9.](#)

## Dichiarazioni di uso previsto

### 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 la preparazione delle 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).

### Uso previsto dello strumento MiSeq™Dx

Lo strumento MiSeqDx 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 MiSeqDx non è previsto per il sequenziamento dell'intero genoma o il sequenziamento *de novo*. Lo strumento MiSeqDx deve essere utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati ed elencati, autorizzati o approvati.

### Uso previsto di MiSeq™Dx Reagent Kit v3

MiSeqDx Reagent Kit v3 Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo previsto per il sequenziamento di librerie di campioni quando utilizzato con saggi convalidati. MiSeqDx Reagent Kit v3 è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx e software analitici.

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

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 di NextSeq™ 550Dx High-Output Reagent Kit v2 (300 cicli)

NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2 (300 cicli) Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo previsto per il sequenziamento di librerie di campioni quando utilizzato con saggi convalidati. Il kit è previsto per l'uso con lo strumento NextSeq 550Dx e software analitici.