

# Kit de amplicones personalizados TruSeq™ Dx

Un kit validado, autorizado por la FDA y con certificación CE-IVD que permite a los laboratorios clínicos diseñar ensayos personalizados para los instrumentos de secuenciación MiSeq™Dx y NextSeq™ 550Dx.

## Puntos destacados

- **Diseño flexible de ensayos**  
Desarrollado para satisfacer necesidades únicas definidas por el usuario
- **Kit validado**  
Especificaciones de rendimiento validadas para la preparación de las bibliotecas con instrumentos y reactivos de secuenciación Illumina Dx
- **Compatible con una gran variedad de tipos de muestra**  
Preparación de bibliotecas optimizada para el ADN extraído de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFPE) y muestras de sangre completa
- **Alta reproducibilidad del ensayo**  
Resultados homogéneos con varios operadores y sistemas

## Introducción

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx (figura 1) es un kit de secuenciación de amplicones validado, autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) de EE. UU. y con certificación de Conformidad Europea para diagnóstico *in vitro* (CE-IVD) que permite que los laboratorios clínicos desarrollen ensayos personalizados de secuenciación de nueva generación (NGS, next generation sequencing). Estos ensayos de secuenciación se pueden utilizar con los instrumentos MiSeqDx y NextSeq 550 Dx, también autorizados por la FDA y con certificación CE-IVD. La combinación del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx y los instrumentos de secuenciación Illumina Dx le brinda una solución integral de ADN a datos con la exactitud y la fiabilidad necesarios en un entorno regulado. Gracias a la potencia de la secuenciación de nueva generación (NGS), los laboratorios clínicos pueden proporcionar a sus clientes una oferta cada vez mayor de aplicaciones de diagnóstico.

## Solución de preparación de bibliotecas validada

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx ofrece una solución de preparación de bibliotecas que incluye reactivos de alta calidad y un flujo de trabajo optimizado. La validación de los reactivos de preparación de bibliotecas garantiza un rendimiento homogéneo entre un lote y otro, lo que permite utilizar los ensayos diseñados durante mucho tiempo y facilita la gestión de los cambios. El uso de reactivos validados elimina la necesidad de gastar valiosos recursos del laboratorio en la revalidación de reactivos o ensayos para

experimentos futuros. Con este flujo de trabajo rápido y eficaz solo hacen falta 50 ng de ADN genómico (ADNg) o 10 µl de ADN FFPE evaluado para producir bibliotecas de secuenciación de alta calidad en menos de dos días.

## Diseño personalizado de ensayos

Con el kit de amplicones personalizados TruSeq Dx, los laboratorios clínicos pueden desarrollar ensayos con sondas de oligonucleótidos personalizados. Esta personalización brinda a los usuarios la flexibilidad necesaria para centrarse en regiones específicas de interés.



**Figura 1: Kit de amplicones personalizados TruSeq Dx:** el kit de amplicones personalizados TruSeq Dx, autorizado por la FDA y con certificación CE-IVD, proporciona reactivos de preparación de bibliotecas que permiten que los laboratorios clínicos desarrollen sus propias pruebas diagnósticas diseñadas para su uso con los instrumentos de secuenciación Illumina Dx.

**Tabla 1: Capacidad de detección del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx**

Parámetro	Línea germinal	Somático
<b>Contexto genómico</b>		
Contenido de GC	19-78 %	19-73 % <sup>a</sup>
Longitud de poli-A	≤ 8	≤ 8
Longitud de poli-T	≤ 10	≤ 10
Longitud de poli-G	≤ 7	≤ 6
Longitud de poli-C	≤ 6	≤ 6
Longitud de repetición dinucleótida	≤ 11x	≤ 4x
Longitud de repetición trinucleótida	≤ 5x	≤ 5x
<b>Variantes</b>		
Polimorfismos de nucleótido único	Sí	Sí, límite de detección del 5 %
Longitud de inserción	≤ 24 pb	≤ 24 pb
Longitud de delección	≤ 25 pb	≤ 25 pb

a. Hasta un 78 % con el instrumento NextSeq 550Dx.

**Para uso diagnóstico *in vitro*.**

**Póngase en contacto con un representante de Illumina para conocer la disponibilidad local.**

Las especificaciones del objetivo (tabla 1) permiten secuenciar más de un 90 % de los exones en los genes RefSeq,<sup>1</sup> en función del diseño del ensayo. La posibilidad de personalizar la configuración del kit también permite flexibilizar la producción de muestras.

## Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx genera bibliotecas listas para la secuenciación que se pueden cargar en un instrumento de secuenciación Illumina Dx para la producción de datos de secuenciación fiables en menos de dos días.



**Figura 2: Flujo de trabajo de ensayos optimizado.** El flujo de trabajo del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx proporciona una solución de ADN a datos con un proceso optimizado de seis pasos.

## Flujo de trabajo optimizado

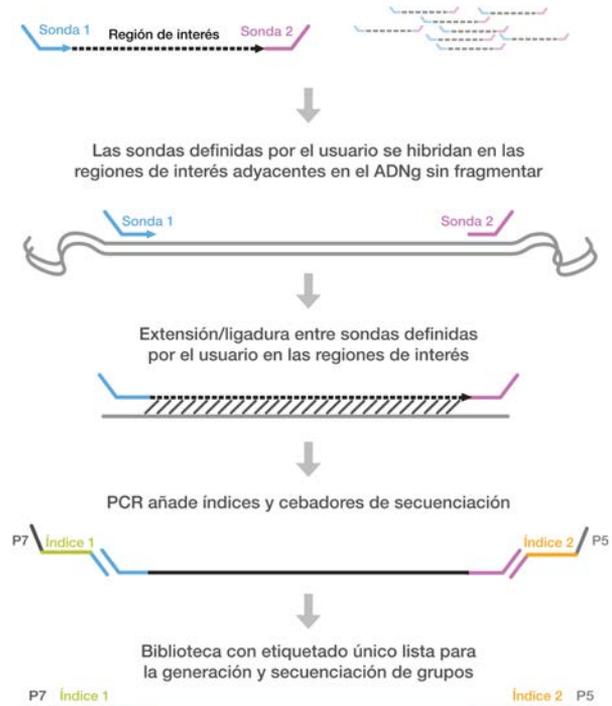
El flujo de trabajo del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx incluye seis pasos básicos (figura 2). Las sondas oligonucleotídicas dirigidas a las regiones de interés se mezclan con la muestra de ADN durante la preparación de bibliotecas. Las bibliotecas se agrupan y, a continuación, se secuencian en un instrumento de secuenciación Illumina Dx. Los datos se recopilan en tiempo real y se analizan con el software Local Run Manager.

### Para uso diagnóstico in vitro.

**Póngase en contacto con un representante de Illumina para conocer la disponibilidad local.**

## Aporte de ADNg o ADN FFPE

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx está optimizado para su uso con 50 ng de ADNg o 10 µl de ADN evaluado procedente de tejidos FFPE. El ADN FFPE se puede evaluar con el kit de amplicones personalizados TruSeq Dx/control de calidad de tejidos FFPE, que utiliza una sencilla reacción de qPCR para determinar la calidad del ADN FFPE. Los resultados del kit de control de calidad de tejidos FFPE se utilizan para asesorar sobre la calidad y la cantidad de aporte de ADN FFPE.



**Figura 3: Procesos químicos de preparación de bibliotecas del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx:** el kit de amplicones personalizados TruSeq Dx utiliza sondas personalizadas para capturar y secuenciar los objetivos de interés definidos.

## Química del ensayo

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx, en combinación con los procesos químicos demostrados de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis), permite capturar y secuenciar únicamente las regiones de interés (figura 3). El ADNg o el ADN FFPE se mezcla con un grupo de sondas oligonucleotídicas definidas por el usuario. Cada sonda incluye secuencias diseñadas para capturar regiones de interés y una secuencia del adaptador utilizada en una reacción de amplificación posterior. Las sondas se hibridan en el ADN, una en sentido ascendente y otra en sentido descendente de la secuencia de ADN objetivo. Una reacción de extensión-ligadura patentada se extiende por la región de interés, seguida de la ligadura para unir las dos sondas. De esta forma, se crea una hebra de cadena molde y se otorga al ensayo una excelente especificidad.

Tabla 2: El estudio de llamada de variantes demuestra la alta reproducibilidad del ensayo<sup>2</sup>

Análisis	Métrica	Tipo de variante	MiSeqDx (8 experimentos)	NextSeq 550Dx (9 experimentos)
Llamada de variantes de líneas germinales	PPA	SNV	99,8 %	> 99,9%
	PPA	Inserción	98,1 %	98,9 %
	PPA	Delección	99,8 %	100 %
	NPA		100 %	100 %
Llamada de variantes somáticas	PPA	SNV	100 %	99,9 %
	PPA	Inserción	100 %	99,9 %
	PPA	Delección	100 %	99,9 %
	NPA		> 99,9%	> 99,9%

Los porcentajes representan el valor más bajo en todos los experimentos. Abreviaturas: coincidencia de porcentaje positivo (PPA, positive percent agreement), coincidencia de porcentaje negativo (NPA, negative percent agreement), variante de nucleótido único (SNV, single nucleotide variant).

Para permitir el análisis simultáneo de varias muestras en un solo experimento de secuenciación (lo que se conoce como “multiplexado”), las bibliotecas individuales se “etiquetan” con un identificador o índice únicos. Estos índices únicos y específicos de cada muestra se añaden durante el paso de amplificación PCR del protocolo de preparación de bibliotecas. El producto final incluye las regiones definidas por el usuario, los adaptadores y los índices necesarios para realizar la secuenciación en un instrumento de secuenciación Illumina Dx.

### Tecnología de NGS de uso más generalizado

Los procesos químicos de SBS de Illumina son la tecnología de nueva generación (NGS) más utilizada en la comunidad de la secuenciación.<sup>3</sup> Mediante la secuenciación masiva en paralelo con un método patentado basado en terminadores reversibles, las bases individuales se detectan a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento. Un terminador marcado con tinta fluorescente se digitaliza mientras se añade cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP o dTTP) y, a continuación, se segmenta para permitir la incorporación de la siguiente base. Como los cuatro dNTP unidos al terminador reversible están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza la tendencia a la incorporación. El resultado es una secuenciación base por base que permite capturar datos con una gran exactitud.<sup>4</sup>

### Datos altamente reproducibles

Para demostrar la alta reproducibilidad de los datos obtenidos con el kit de amplicones personalizados TruSeq Dx y los procesos químicos de SBS, se realizó un estudio de precisión de la llamada de variantes con un ensayo representativo. En el estudio se emplearon varios operadores, instrumentos y lotes en 8-9 experimentos (tabla 2).

### Resumen

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx brinda una solución validada y autorizada por la FDA para el diseño de ensayos de NGS dirigidos a regiones genómicas de interés definidas por el usuario.

Este kit permite a los laboratorios clínicos aprovechar la velocidad y exactitud de la NGS, así como prestar a sus clientes una oferta de servicios de diagnóstico cada vez mayor.

### Información adicional

Para obtener más información acerca del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx, visite [www.illumina.com/TSCAKitDx](http://www.illumina.com/TSCAKitDx).

Para obtener más información acerca del instrumento MiSeqDx, visite [www.illumina.com/MiSeqDx](http://www.illumina.com/MiSeqDx).

Para obtener más información acerca del instrumento NextSeq 550Dx, visite [www.illumina.com/nextseq550dx](http://www.illumina.com/nextseq550dx).

### Datos del pedido

Producto	N.º de referencia
Kit de amplicones personalizados TruSeq Dx <sup>a</sup>	20005718
Kit de amplicones personalizados TruSeq Dx/control de calidad de tejidos FFPE <sup>a</sup>	20006259
Instrumento MiSeqDx	DX-410-1001
Kit de reactivos MiSeqDx v3 <sup>a,b</sup>	20012552
Kit de reactivos MiSeqDx v3 <sup>a,b</sup>	20037124
Instrumento NextSeq 550Dx	20005715
Kit de reactivos de alto rendimiento NextSeq 550Dx v2 (300 ciclos) <sup>a</sup>	20019554
Kit de fijación de placa de índices TruSeq	DX-130-1005
Kit de collar y fijación de la placa de índices TruSeq	DX-130-1007

- Los consumibles de secuenciación de clase I se envían en un solo lote e incluyen pruebas de lote de kit, notificaciones previas a las modificaciones y un certificado de análisis en cada lote. Los reactivos se desarrollan conforme a principios de control del diseño, se fabrican conforme a las prácticas recomendadas de fabricación actuales y se verifican para garantizar el cumplimiento de las especificaciones.
- Los números de catálogo 20012552 y 20037124 tienen los mismos reactivos. El número de catálogo utilizado depende del país o de la región del cliente.

**Para uso diagnóstico in vitro.**

**Póngase en contacto con un representante de Illumina para conocer la disponibilidad local.**

## Referencias

1. Base de datos de secuencias de referencia del NCBI (RefSeq). [www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/). Acceso: 10 de octubre de 2017.
2. Datos en archivo. Illumina, Inc. 2017.
3. Cálculos de datos en archivo. 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.

## Declaraciones de uso previsto

### Uso previsto del kit de amplicones personalizados TruSeq™ Dx

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles que se utilizan para preparar las bibliotecas de muestras de ADN extraídas de sangre completa periférica y de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE). Para la preparación de bibliotecas centradas en regiones de interés genómicas específicas hacen falta reactivos de analitos específicos proporcionados por el usuario. Las bibliotecas de muestras resultantes están concebidas para utilizarse con los analizadores de secuencias de ADN de alto rendimiento de Illumina.

### Uso previsto del kit de amplicones personalizados TruSeq™ Dx/control de calidad de tejidos FFPE

El kit de control de calidad FFPE de amplicones personalizados TruSeq Dx de Illumina es un juego de reactivos que se utiliza para establecer el potencial de amplificación de ADN genómico (ADNg) que se ha extraído de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE).

### Uso previsto del instrumento MiSeq™Dx

El instrumento MiSeqDx se ha concebido para la secuenciación selectiva de bibliotecas 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. El instrumento MiSeqDx no está indicado para la secuenciación de genoma completo o *de novo*. El instrumento MiSeqDx se debe utilizar con un software de análisis y reactivos de DIV registrados y catalogados, autorizados o aprobados.

### Uso previsto del kit de reactivos MiSeq™Dx v3

El kit de reactivos MiSeqDx v3 de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles que se utiliza para la secuenciación de bibliotecas de muestras con ensayos validados. El kit de reactivos MiSeqDx v3 está diseñado para su uso con el instrumento MiSeqDx y el software de análisis correspondiente.

### Uso previsto del instrumento NextSeq™ 550Dx (Unión Europea / otros)

El instrumento NextSeq 550Dx está concebido para la secuenciación de bibliotecas de ADN cuando se utiliza con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) realizados en el instrumento. El instrumento NextSeq550 Dx debe utilizarse con reactivos de DIV y software de análisis específicos que estén registrados, certificados o aprobados.

### Uso previsto del kit de reactivos de alto rendimiento NextSeq™ 550Dx v2 (300 ciclos)

El kit de reactivos de alto rendimiento NextSeq 550Dx v2 (300 ciclos) de Illumina es un conjunto de reactivos y consumibles diseñado para la secuenciación de bibliotecas de muestras con ensayos validados. El kit está diseñado para utilizarse con el instrumento NextSeq 550Dx y el software de análisis correspondiente.