

Panel de cáncer hereditario de TruSight™

Contenido definido por expertos dirigido a los genes asociados a una predisposición a diferentes tipos de cáncer proporcionado con una tecnología de secuenciación de próxima generación demostrada.

Puntos destacados

- **Contenido integral para evaluar mutaciones de la línea germinal.**

El panel incluye 113 genes seleccionados por expertos que se asocian a una predisposición al cáncer hereditario

- **Flujo de trabajo rápido con Nextera Flex™ para el enriquecimiento**

Protocolo sencillo que permite preparar y enriquecer la biblioteca en 6,5 horas, con 2 horas de participación activa

- **Opciones versátiles con los sistemas de Illumina**

La compatibilidad con todos los secuenciadores de sobremesa de Illumina permite una productividad de muestras que varía de 2 a 256 muestras por experimento

- **Datos de secuenciación de alta calidad**

El enriquecimiento de captura híbrida proporciona una buena uniformidad de la cobertura para detectar SNV, indels y CNV de forma precisa

Tabla 1: Especificaciones del panel de cáncer hereditario de TruSight

Parámetro	Detalles
Sistema	Sistema iSeq™ 100, sistema MiniSeq™, MiSeq System, sistema NextSeq™ 550, sistema NextSeq 550Dx (en el modo de investigación)
Tamaño del panel	403 kb, 113 genes (que cubren todo los exones), 125 SNP (48 ID SNP y 77 SNP para la puntuación de riesgo poligénico)
Número de sondas	10 341 sondas de oligonucleótidos
Tipo de muestra	ADN genómico, sangre, ^a o saliva ^a
Aporte de ADN	ADN de 50–1000 ng
Duración total del ensayo	48 horas desde el ADN a los datos
Tiempo de preparación de bibliotecas	Duración total de 6,5 horas, 2 horas de tiempo de participación activa
Productividad de muestras	384 índices disponibles para una productividad variable de 2 a 256 muestras por análisis, con una cobertura promedio de 300x (cobertura mínima 100x)
Muestras por tubo	8 enriquecimientos (hasta 12 muestras por enriquecimiento)

a. La extracción directa de sangre o saliva requiere el uso del Kit flexible de reactivos de lisis (producto accesorio).

Introducción

A medida que aprendamos más acerca del papel que juegan las variantes genéticas en la predisposición al cáncer, los investigadores podrán beneficiarse de la posibilidad de realizar una evaluación integral de los genes en los que se encuentran estas variantes. El panel de cáncer hereditario de TruSight proporciona esta capacidad a los laboratorios. El panel de cáncer hereditario de TruSight, que ha sido desarrollado en colaboración con expertos en genómica del cáncer, es un panel de secuenciación diseñado para evaluar las mutaciones de la línea germinal en 113 genes y 125 polimorfismos de nucleótido único (SNP) con fines de identificación y puntuación del riesgo poligénico.

El ensayo utiliza sondas de oligonucleótidos prediseñadas y listas para usar que cubren todas las regiones exónicas y 20 pb de regiones intrónicas adyacentes de cada gen objetivo. Este ensayo utiliza un proceso químico de captura híbrida integrada con Nextera Flex para el enriquecimiento, el proceso químico de preparación de bibliotecas más reciente de Illumina.¹ Nextera Flex para el enriquecimiento es un 85 % más rápido que la preparación y el enriquecimiento habituales de bibliotecas de Illumina, y utiliza un innovador proceso químico basado en bolas con un único paso de hibridación simplificado. Nextera Flex para enriquecimiento también es compatible con todos los secuenciadores de sobremesa de Illumina, lo que aporta versatilidad

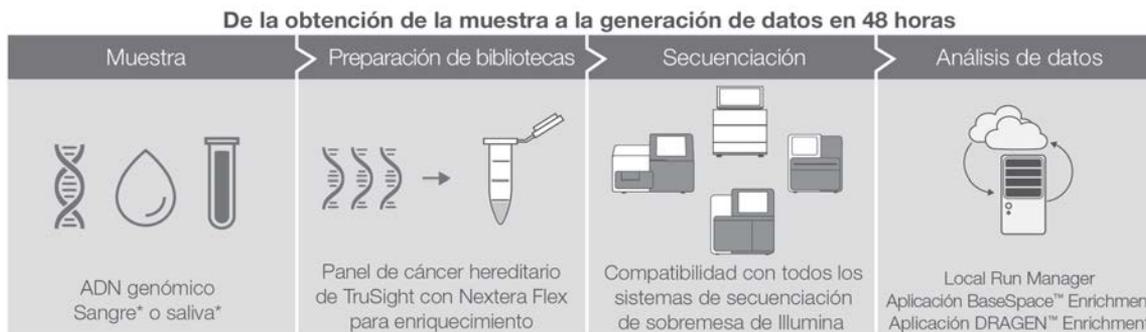


Figura 1: Flujo de trabajo de NGS rápido y versátil: El panel de cáncer hereditario de TruSight se ha desarrollado con la química de preparación de bibliotecas Nextera Flex, que integra los pasos de preparación y enriquecimiento de la biblioteca. Mediante un flujo de trabajo rápido, simplificado y optimizado, se obtienen bibliotecas completamente enriquecidas en tan solo 6,5 horas. Cáncer hereditario de TruSight también es compatible con los sistemas de las series iSeq 100, MiniSeq, MiSeq y NextSeq

*La extracción directa de sangre o saliva requiere el uso del Kit flexible de reactivos de lisis (producto accesorio).



Figura 2: Intervalo de productividad disponible con el panel de cáncer hereditario de TruSight en cuatro sistemas de secuenciación de Illumina.

Tabla 2: Preparación de lotes y variación de rendimiento entre instrumentos y kits de reactivos

Sistema de secuenciación ^a	Kit	Lecturas únicas	Resultado	Tiempo de procesamiento	Plexicidad de la muestra ^b
Sistema iSeq 100	100 i1	4 M	1,2 Gb	19 horas	2
	v2 Micro	4 M	1,2 Gb	19 horas	2
Serie MiSeq	v2 Standard	15 M	4,5 Gb	24 horas	9
	v3 Standard	25 M	7,5 Gb	28 horas	16
MiniSeq System	Rendimiento medio	8 M	2,4 Gb	17 horas	5
	Rendimiento elevado	25 M	7,5 Gb	24 horas	16
Serie NextSeq	Rendimiento medio	130 M	39 Gb	26 horas	80
	Rendimiento elevado	400 M	120 Gb	39 horas	256

a. Los rendimientos y tiempos teóricos de los sistemas iSeq 100 y MiniSeq se basan en las especificaciones del instrumento. La verificación interna del panel de cáncer hereditario de TruSight solo se ha realizado en los sistemas MiSeq y NextSeq.

b. El rendimiento de la muestra se basa en una cobertura promedio de 300x por muestra.

en el diseño experimental con una amplia variedad de rendimiento de muestras (Tabla 1). Al combinar la velocidad de Nextera con el MiSeq System, el flujo de trabajo completo (Figura 1) puede llevarse a cabo en 48 horas, desde la obtención de la muestra hasta la generación de los datos.

Rendimiento versátil con los sistemas de secuenciación de Illumina

El panel de cáncer hereditario de TruSight es compatible con varios sistemas de secuenciación de Illumina y proporciona versatilidad y control sobre el diseño del experimento. Los usuarios pueden seleccionar instrumentos o kits de reactivos en función de las necesidades del laboratorio. El rendimiento de muestras puede variar de 2 a 256 muestras por experimento (Figura 2, Tabla 2).

Diseño de contenido exhaustivo

El panel de cáncer hereditario de TruSight incluye una amplia lista de genes que suelen estar asociados a una predisposición hereditaria a cánceres de mama, colon, ovario y gástrico. El contenido ha sido desarrollado con aportaciones y comentarios de líderes de opinión clave de la evaluación del riesgo genético. El panel incluye 10 341 sondas dirigidas a 113 genes (Tabla 3) que se relacionan con la predisposición al cáncer, que se recomiendan en las directrices clave

(Figura 3) y que se han evaluado en estudios de casos de la población frente a controles. Asimismo, se incluyen 48 SNP para la determinación de la identidad y el sexo, y 77 SNP para la puntuación del riesgo poligénico BOADICEA.^{2,3} El análisis permite detectar variantes de nucleótido único (SNV), inserciones/delecciones (indeles) y variantes en el número de copias (CNV) en un único ensayo.

Tipo de cáncer	Genes recomendados para el análisis
Mama	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53
Colon	APC, AXIN2, BMPR1A, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3, MUTYH, NTLH1, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53
Ovárico	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53
Gástrico	CDH1
Otro	MEN1, NF2, RB1, RET, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, TSC1/2, VHL, TP53, WT1

Figura 3: Genes incluidos en las directrices clave asociados con la reducción de riesgo

Tabla 3: Contenido genético del panel de cáncer hereditario de TruSight

<i>ACD</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>GREM1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SDHD</i>
<i>AIP</i>	<i>EPCAM</i>	<i>HOXB13</i>	<i>PMS2</i>	<i>SLX4</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>KIF1B</i>	<i>POLD1</i>	<i>SMAD4</i>
<i>APC</i>	<i>ERCC2</i>	<i>KIT</i>	<i>POLE</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>ATM</i>	<i>ERCC3</i>	<i>LZTR1</i>	<i>POT1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>BAP1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>MAX</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>SMARCE1</i>
<i>BARD1</i>	<i>ERCC5</i>	<i>MEN1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SPINK1</i>
<i>BLM</i>	<i>FAM175A</i>	<i>MET</i>	<i>PTEN</i>	<i>SPRED1</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>FANCA</i>	<i>MITF</i>	<i>RAD50</i>	<i>STK11</i>
<i>BRCA1</i>	<i>FANCB</i>	<i>MLH1</i>	<i>RAD51</i>	<i>SUFU</i>
<i>BRCA2</i>	<i>FANCC</i>	<i>MRE11A</i>	<i>RAD51B</i>	<i>TERF2IP</i>
<i>BRIP1</i>	<i>FANCD2</i>	<i>MSH2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>TERT</i>
<i>CASR</i>	<i>FANCE</i>	<i>MSH3</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TMEM127</i>
<i>CDC73</i>	<i>FANCF</i>	<i>MSH6</i>	<i>RB1</i>	<i>TP53</i>
<i>CDH1</i>	<i>FANCG</i>	<i>MUTYH</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TSC1</i>
<i>CDK4</i>	<i>FANCI</i>	<i>NBN</i>	<i>RET</i>	<i>TSC2</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>FANCL</i>	<i>NF1</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>VHL</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FANCM</i>	<i>NF2</i>	<i>RINT1</i>	<i>WT1</i>
<i>CEBPA</i>	<i>FH</i>	<i>NSD1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>XPA</i>
<i>CHEK2</i>	<i>FLCN</i>	<i>NTHL1</i>	<i>SDHA</i>	<i>XPC</i>
<i>CTRC</i>	<i>GALNT12</i>	<i>PALB2</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>XRCC2</i>
<i>DDB2</i>	<i>GATA2</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SDHB</i>	
<i>DICER1</i>	<i>GPC3</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>SDHC</i>	

Para obtener la lista completa de SNP incluidos en el panel, visite www.illumina.com/TruSightHereditaryCancer.

Flujo de trabajo rápido de preparación y enriquecimiento de biblioteca

El panel de cáncer hereditario de TruSight utiliza Nextera Flex para enriquecimiento, que permite finalizar el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca en 6,5 horas con solo 2 horas de tiempo de participación activa. Un componente clave de la solución de enriquecimiento Nextera Flex es la tagmentación en bolas, que utiliza transposomas unidos a bolas para mediar en una reacción de tagmentación uniforme (Figura 4). Con esta estrategia no son necesarios pasos de fragmentación del ADN separados. Para aportes de ADN entre 10 y 50 ng, la normalización del ADN por saturación también evita la necesidad de pasos individuales de cuantificación y normalización de la biblioteca antes del enriquecimiento. El enriquecimiento del objetivo se produce mediante el reconocido proceso químico de captura híbrida, que permite detectar de forma fiable las variantes relevantes para SNV, indels y CNV. Las bibliotecas se hibridan con sondas marcadas con biotina específicas para las regiones de ADN objetivo. Los objetivos se capturan agregando bolas magnéticas de estreptavidina que se unen a las sondas con biotina y luego extraen de la solución los fragmentos unidos. Una vez que los fragmentos capturados se eluyen de las bolas, la biblioteca objetivo está lista para la secuenciación.

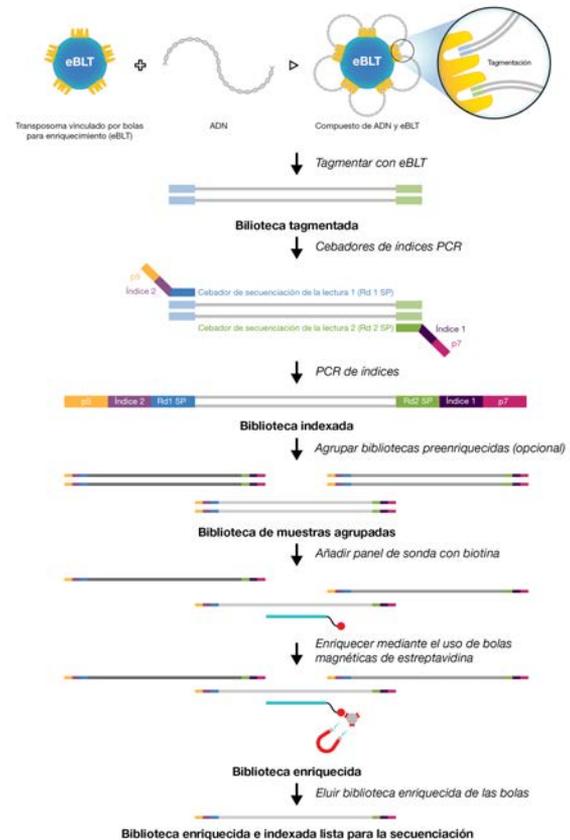


Figura 4: Nextera Flex para enriquecimiento: Una reacción de tagmentación uniforme mediada por eBLT seguida de una reacción de hibridación única permite un flujo de trabajo rápido y versátil.

Datos precisos

Con capacidad para evaluar 113 genes por muestra, el panel de cáncer hereditario de TruSight proporciona un gran rendimiento de muestras al tiempo que conserva una especificidad y uniformidad excelentes. Para demostrar el rendimiento del ensayo, se analizaron las métricas de secuenciación de dos sistemas de secuenciación utilizando muestras de colaboradores de la investigación. Se preparó un aporte de ADN de 50 ng procedente de ocho muestras replicadas utilizando Nextera Flex para el enriquecimiento, con enriquecimientos con 8 unidades de plexado, se secuenció en el MiSeq System y en el sistema NextSeq y los datos se evaluaron con la versión 3.1.0 de la aplicación BaseSpace Enrichment. En los resultados se observó un elevado porcentaje de uniformidad de la cobertura (Figura 5).

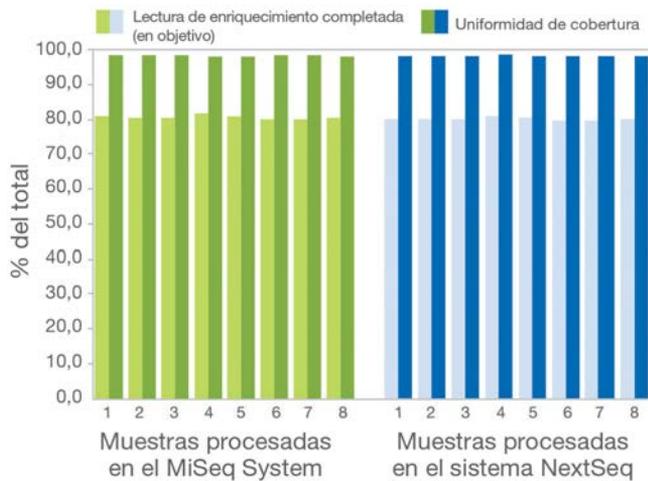


Figura 5: Alineación en el objetivo y uniformidad de cobertura: El ADN extraído de las muestras de colaboradores se preparó utilizando el panel de cáncer hereditario de TruSight y se secuenciaron en el MiSeq System (izquierda) y el sistema NextSeq (derecha). Se muestran los valores promedio de dos réplicas técnicas para cada muestra.

Llamadas de variantes

Para demostrar el rendimiento de las llamadas de variantes con diferentes niveles de aporte, se prepararon conjuntos de 16 muestras con aportes de ADN de 10 ng, 25 ng y 50 ng. Los conjuntos de muestras se componían de cuatro réplicas de cada una de las muestras de Horizon Discovery (HD), los estándares de referencia de ADNg BRCA Germline I (HD793) y BRCA Germline II (HD794). Cada nivel de aporte fue secuenciado en 16 unidades de plexado después de prepararse con Nextera Flex para enriquecimiento con enriquecimientos de 8 unidades de plexado. La secuenciación se realizó en el MiSeq System y los datos se evaluaron mediante la aplicación DRAGEN Enrichment. Los resultados coincidían con la lista publicada de Horizon Discovery para las muestras de HD793 y HD794, lo que demuestra resultados reproducibles en todos los niveles de aporte analizados (Tabla 4).

Se realizó otro un análisis en las muestras de los colaboradores de la investigación que contenían variantes desconocidas. Se preparó un aporte de ADN de 50 ng de ocho muestras por replicadas usando Nextera Flex para enriquecimiento con enriquecimientos de 8 unidades de plexado y se secuenciaron en el MiSeq System. Mediante el uso de la aplicación DRAGEN Enrichment para el análisis de los datos, se detectaron variantes de diferentes clases (SNV, indels y CNV) (Tabla 5), que se correlacionaban con genotipos previamente comunicados por nuestro colaborador. Las aplicaciones DRAGEN Enrichment o BaseSpace Enrichment se pueden usar para que las llamadas de variantes proporcionen los resultados en formato VCF. Los clientes pueden seleccionar cualquier plataforma de análisis terciario de terceros para anotar e interpretar las variantes.

Resumen

El panel de cáncer hereditario de TruSight permite a los investigadores acceder a un conjunto de contenidos definido por expertos con el que analizar la variación dentro de genes previamente vinculados a una predisposición al cáncer. El conjunto de sondas optimizado proporciona una completa cobertura de las regiones objetivo con una elevada uniformidad de cobertura para identificar muchas variantes. La combinación de este contenido con el método Nextera Flex para enriquecimiento ofrece un flujo de trabajo rápido y sencillo con pocos requisitos de aporte de muestras, así como la versatilidad de poder usar cualquier sistema de secuenciación de sobremesa de Illumina. El panel de cáncer hereditario de TruSight es una solución de secuenciación de gran eficacia que acelera la detección de variantes asociadas a una predisposición al cáncer.

Información adicional

Para obtener más información sobre el Panel de cáncer hereditario de TruSight, visite

www.illumina.com/TruSightHereditaryCancer

Referencias

1. Illumina (2018). Hoja de datos de Nextera Flex para enriquecimiento.
2. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(5). pii:djv036. doi: 10.1093/jnci/djv036.
3. BOADICEA-Centre for Cancer Genetic Epidemiology. (ccge.medschl.cam.ac.uk/boadicea/). Acceso: 17 de noviembre de 2019.

Tabla 4: Detección de variantes en muestras de Horizon Discovery con el panel de cáncer hereditario de TruSight y la aplicación DRAGEN Enrichment

Muestra	Gen	Variante	Tipo de variante	Consecuencia	MAF prevista	MAF observada en diferentes aportes de ADN		
						50 ng	25 ng	10 ng
HD793	<i>BRCA1</i>	P871L	SNV	Mutación con cambio de sentido	100 %	100 %	100 %	99,8 %
	<i>BRCA1</i>	S1613G	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	49,8 %	47,7 %	45,8 %
	<i>BRCA1</i>	K1183R	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	45,0 %	43,9 %	44,9 %
	<i>BRCA1</i>	K820E	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	48,1 %	43,6 %	45,6 %
	<i>BRCA1</i>	D435Y	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	42,8 %	46,3 %	44,6 %
	<i>BRCA2</i>	V2466A	SNV	Mutación con cambio de sentido	100 %	99,9 %	100 %	100 %
	<i>BRCA2</i>	N289H	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	39,2 %	40,5 %	40,5 %
	<i>BRCA2</i>	N991D	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	48,6 %	48,1 %	48,0 %
	<i>BRCA2</i>	N1784fs	Delección	Mutación por desplazamiento del marco de lectura	50 %	42,2 %	35,7 %	38,9 %
	<i>BRIP1</i>	S919P	SNV	Mutación con cambio de sentido	100 %	99,7 %	99,9 %	100 %
HD794	<i>NBN</i>	E185Q	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	41,1 %	35,1 %	38,5 %
	<i>BARD1</i>	R378S	SNV	Mutación con cambio de sentido	50 %	50,5 %	49,9 %	48,0 %
	<i>BRCA2</i>	V2466A	SNV	Mutación con cambio de sentido	100 %	99,9 %	99,9 %	99,8 %
	<i>BRCA2</i>	I2675fs	Inserción	Mutación por desplazamiento del marco de lectura	50 %	41,0 %	40,9 %	40,3 %
	<i>BRIP1</i>	S919P	SNV	Mutación con cambio de sentido	100 %	99,9 %	100 %	100 %
	<i>NBN</i>	E185Q	SNV	Mutación con cambio de sentido	100 %	100 %	100 %	100 %

La secuenciación se realizó en el MiSeq System. La alineación y la llamada de variantes se realizaron con la aplicación DRAGEN Enrichment. Los valores de la frecuencia del alelo menos común (MAF) observados son los valores promedio de cuatro réplicas técnicas.

Tabla 5: Detección de variantes en muestras colaborativas con el panel de cáncer hereditario de TruSight y la aplicación DRAGEN Enrichment

Muestra	Gen	Alelo de referencia	Alelo de la variante	Tipo de variante	Consecuencia	MAF de repl. 1	MAF de repl. 2
1	Solapamiento de <i>PALB2</i>			CNV	Cambios en el número de copias (pérdida de exones 7–13)	Detectado	Detectado
2	<i>RB1</i>	T	TTCAAAA	Inserción	Inserción dentro del marco de lectura	54,1 %	53,6 %
	<i>TSC2</i>	C	T	SNV	Detención obtenida	49,8 %	47,5 %
3	<i>POLE</i>	C	T	SNV	Variante con cambio de sentido	44,1 %	47,0 %
4	<i>CHEK2</i>	A	G	SNV	Variante con cambio de sentido	40,8 %	44,9 %
5	<i>MSH6</i>	GA	G	Delección	Variante por desplazamiento del marco de lectura	50,9 %	45,0 %
6	<i>BRCA2</i>	CG	C	Delección	Variante por desplazamiento del marco de lectura	29,9 %	36,3 %
7	<i>MLH1</i>	C	T	SNV	Detención obtenida	31,0 %	31,9 %
8	<i>BRCA1</i>	T	C	SNV	Variante con cambio de sentido	39,6 %	35,1 %

La secuenciación se realizó en el MiSeq System. La alineación y la llamada de variantes se realizaron con la aplicación DRAGEN Enrichment. Las llamadas de variantes observadas se correlacionan con genotipos previamente comunicados por nuestro colaborador (los datos no se muestran).

Datos para realizar pedidos

Producto	Categoría	N.º de catálogo
TruSight Hereditary Cancer - Oligonucleótidos de enriquecimiento solamente	Oligonucleótidos de enriquecimiento (8 reacciones de enriquecimiento, hasta 12 muestras por enriquecimiento)	20029551
Reactivos de preparación y enriquecimiento de bibliotecas previa al enriquecimiento Nextera DNA Flex	Reactivos de preparación y enriquecimiento de bibliotecas (96 muestras, 8 reacciones de enriquecimiento de 12 unidades de plexado)	20025524
Reactivos de preparación y enriquecimiento de bibliotecas previa al enriquecimiento Nextera DNA Flex	Reactivos de preparación y enriquecimiento de bibliotecas (16 muestras, 16 reacciones de enriquecimiento de 1 unidad de plexado)	20025523
Reactivos de preparación de bibliotecas previa al enriquecimiento Nextera DNA Flex	Reactivos de preparación y enriquecimiento de bibliotecas (96 muestras)	20025520
Reactivos de preparación de bibliotecas previa al enriquecimiento Nextera DNA Flex	Reactivos de preparación y enriquecimiento de bibliotecas (16 muestras)	20025519
IDT para Illumina - Índices dobles únicos de ADN de Nextera, Juego A	Adaptadores de índice (96 índices, 96 muestras)	20027213
IDT para Illumina - Índices dobles únicos de ADN de Nextera, Juego B	Adaptadores de índice (96 índices, 96 muestras)	20027214
IDT para Illumina - Índices dobles únicos de ADN de Nextera, Juego C	Adaptadores de índice (96 índices, 96 muestras)	20027215
IDT para Illumina - Índices dobles únicos de ADN de Nextera, Juego D	Adaptadores de índice (96 índices, 96 muestras)	20027216
Reactivo i1 de iSeq 100	Kit individual de 300 ciclos	20021533
Paquete de 4 reactivos iSeq 100 i1	Kit cuádruple de 300 ciclos	20021534
MiSeq Reagent Micro Kit v2	Kit de 300 ciclos	MS-103-1002
MiSeq Reagent Kit v2	Kit de 300 ciclos	MS-102-2002
Kit de reactivos de MiSeq v3	Kit de 600 ciclos	MS-102-3003
MiniSeq Mid Output Kit	Kit de 300 ciclos	FC-420-1004
MiniSeq High Output Kit	Kit de 300 ciclos	FC-420-1003
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5	Kit de 300 ciclos	20024905
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5	Kit de 300 ciclos	20024908
Kit flexible de reactivos de lisis	96 reacciones	20018706

Illumina, Inc. • 1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU) • +1 858 202 4566 tel • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2019 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, visite www.illumina.com/company/legal.html. N.º No. 1170-2019-012-A ESP QB9117

