

# Detecte variantes somáticas raras em amostras de tumor FFPE usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

- Identificadores moleculares exclusivos para correção de erros permitem maior precisão durante o sequenciamento
- Compatível com painéis de enriquecimento fornecidos pelo usuário para um design experimental flexível
- O fluxo de trabalho escalável acomoda DNA extraído de biópsia líquida e de amostras de tecido FFPE



## Introdução

Amostras de tecido FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded, fixadas em formalina e embebidas em parafina) são uma importante fonte de materiais disponíveis para a caracterização molecular de tumores. Infelizmente, o processo de fixação e as amostras de tecido embebidas em parafina podem causar fragmentação, reticulação ou modificações químicas dos ácidos nucleicos.<sup>1</sup> Isso leva a uma qualidade baixa ou variável de ácido nucleico, que pode tornar a análise genética desafiadora, especialmente para detectar mutações raras. Como resultado, são necessários fluxos de trabalho consistentes e sensíveis de sequenciamento de última geração (NGS, next-generation sequencing) para processar os materiais de entrada das amostras FFPE para análise posterior.

A combinação dos achados da análise genômica da biópsia de tecido com dados complementares da biópsia líquida fornece informações abrangentes sobre a biologia do tumor. O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é um kit versátil de preparação de bibliotecas que pode ser usado para preparar bibliotecas prontas para sequenciamento com base no DNA circulante livre de células (cfDNA) ou no DNA genômico (gDNA) extraído das amostras de tecido FFPE (Figura 1). O fluxo de trabalho inclui UMIs (unique molecular identifiers, identificadores moleculares exclusivos) para correção de erros e redução de falsos positivos, permitindo a detecção precisa e sensível de mutações de baixa frequência em amostras de tumor FFPE. O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é compatível com sondas ou painéis de enriquecimento da Illumina ou de terceiros para permitir um design experimental flexível. Esta nota de aplicação demonstra o excelente desempenho do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment em gerar bibliotecas NGS de alta qualidade e em identificar variantes somáticas de baixa frequência usando amostras FFPE.

## Métodos

### Amostras

As bibliotecas foram preparadas com base em uma combinação de amostras FFPE de tecido humano e linhagens celulares FFPE (Tabela 1). As linhagens celulares FFPE testadas foram Horizon Discovery (n.ºs de catálogo HD301 e HD653) e SeraCare Life Sciences\* (FFPE TST Custom DNav2). As amostras FFPE de tecido humano foram fornecidas pelo Sistema de inventário de amostras biológicas da Illumina. O DNA FFPE foi extraído usando o AllPrep DNA/RNA FFPE kit (QIAGEN, n.º de catálogo 80234), quantificado com o Qubit dsDNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo Q32850) e qualificado usando o TruSeq Custom Amplicon Dx-FFPE QC kit (Illumina, n.º de catálogo 20006259).

### Fragmentação de DNA

Foi usado cisalhamento mecânico para fragmentação de DNA. O DNA extraído de amostras FFPE foi diluído em solução tampão Tris-EDTA (TE) em 0,23 ng/μl para entrada de 10 ng, 0,45 ng/μl para entrada de 20 ng ou 0,90 ng/μl para entrada de 40 ng. Em seguida, 52 μl de cada amostra diluída foram sonicados em um poço de 8 microTUBE Strip (Covaris, n.º de catálogo 520053) usando o processador ultrassônico Covaris LE220 Focused (Tabela 2).

\*A SeraCare Life Sciences agora é parte da LCG Diagnostics.



Figura 1: fluxo de trabalho do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment para processamento de amostras FFPE.

Tabela 1: Amostras analisadas usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

ID da amostra	Tipo de amostra	Fonte da amostra	Valor de $\Delta Cq$
8752	Tecido FFPE (humano)	Câncer de pulmão de células não pequenas	5,7
315	Tecido FFPE (humano)	Câncer de pulmão de células não pequenas	5,5
4075	Tecido FFPE (humano)	Câncer colorretal	4,2
679	Tecido FFPE (humano)	Câncer de mama	4,1
11883	Tecido FFPE (humano)	Câncer colorretal	2,9
3952	Tecido FFPE (humano)	Câncer de mama	2,2
448	Tecido FFPE (humano)	Câncer de pulmão de células não pequenas	2,1
449	Tecido FFPE (humano)	Câncer de pulmão de células não pequenas	1,5
FFPE TST Custom DNAv2	Linhagem celular FFPE	N/A	0,87
HD653	Linhagem celular FFPE	N/A	-1,23
HD301	Linhagem celular FFPE	N/A	-1,87

Tabela 2: Configurações de cisalhamento recomendadas para processadores ultrassônicos Covaris

Configuração	Covaris LE220	Covaris E220	Covaris ME220
Potência incidente de pico	450 watts	175 watts	50 watts
Ciclo de trabalho	30%	10%	30%
Ciclos por disparo	200	200	1.000
Tempo de tratamento	250 s	280 s	10 s
Temperatura	7 °C	7 °C	12 °C
Repetições de pulsos	N/A	N/A	20
Potência média	N/A	N/A	15 watts
Outros	N/A	Intensificador	Guia de ondas

Os dados para este estudo foram gerados com o processador ultrassônico Covaris LE220 Focused.

## Preparação e enriquecimento da biblioteca

Após a sonicação, as bibliotecas foram preparadas com DNA fragmentado de acordo com as instruções detalhadas no guia do usuário do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Foram usados protocolos específicos de enriquecimento, dependendo do tipo de painel e do formato do enriquecimento. Para este estudo, dois painéis de enriquecimento foram usados, um painel personalizado de 2.000 kb de DNA de fita única (ssDNA, single-stranded DNA) de 80 bp e um Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel de 37,5 Mb de DNA de fita dupla (dsDNA, double-stranded DNA) de 120 bp. O enriquecimento foi realizado seguindo o fluxo de trabalho de enriquecimento 1-plex ou 4-plex, conforme descrito no [guia do usuário do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#).

## Sequenciamento

As bibliotecas enriquecidas pelo Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel foram sequenciadas<sup>†</sup> no NovaSeq™ 6000 System com duração da leitura de 2 × 151 bp. Todas as outras bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq™ 550 System com duração da leitura de 2 × 149 bp.

<sup>†</sup> O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é compatível com todos os sistemas Illumina de médio a alto rendimento. Entretanto, o desempenho das bibliotecas usando amostras FFPE só foi demonstrado nos sistemas NovaSeq 6000 e NextSeq 550.

## Análise de dados

Para análise de dados na nuvem, os dados brutos de sequenciamento (arquivos BCL) sofreram demultiplexação e foram convertidos em arquivos FASTQ no BaseSpace™ Sequence Hub. Foi realizada uma análise secundária posterior com o DRAGEN™ Enrichment App v4.0.3 habilitando um identificador de pequenas variantes somáticas com configurações padrão. UCSC hg 19 Alt-Aware foi usado como genoma humano de referência. As configurações de UMI foram ativadas, com a identificação de variante UMI-aware definida como “baixa profundidade”. O número mínimo de leituras de suporte para UMI foi definido como 1. A anotação de variantes pelo Illumina Connected Annotation (anteriormente denominado Nirvana) para marcação de linha genética foi habilitada, com argumentos adicionais da linha de comando do DRAGEN.‡ As variantes de passagem foram filtradas usando bcftools 1.17 e comparadas com variantes de referência usando rtg vcfeval 3.12.1.

## Resultados

Para demonstrar o excelente desempenho do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment na geração de bibliotecas de sequenciamento de alta qualidade com base em DNA FFPE, as principais métricas de desempenho foram avaliadas para DNA extraído de linhagens celulares FFPE e de amostras tumorais FFPE.

### Excelentes métricas de desempenho de biblioteca para amostras FFPE

A cobertura-alvo média foi avaliada em duas profundidades de sequenciamento, 10 milhões e 20 milhões de clusters, para garantir que as bibliotecas preparadas tivessem a profundidade de cobertura necessária em todas as regiões-alvo para permitir a detecção de variantes de baixa abundância. Os achados demonstram que o DNA FFPE de alta qualidade ( $\Delta Cq \leq 2$ ) gera bibliotecas que atingem  $>100\times$  a profundidade da cobertura-alvo média mesmo com entradas de DNA da ordem de 10 ng (Figura 2). A cobertura diminui com a má qualidade da amostra ( $\Delta Cq$  mais alto), mas pode ser melhorada com sequenciamento mais profundo ou aumento na entrada (Figura 2B). O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit produz bibliotecas com comprimento de fragmento  $>110$  bp e produz dados de sequenciamento de alta qualidade, avaliados como enriquecimento de leitura e percentual de alvos com cobertura  $\geq 50\times$  para amostras FFPE com  $\Delta Cq \leq 4$  (Figura 2C).

‡ --umi-verbose-metrics true --umi-start-mask-length 1 --umi-end-mask-length 3 --germline-tagging-db-threshold 10 --tmb-enable-proxi-filter true --vc-enable-germline-tagging true

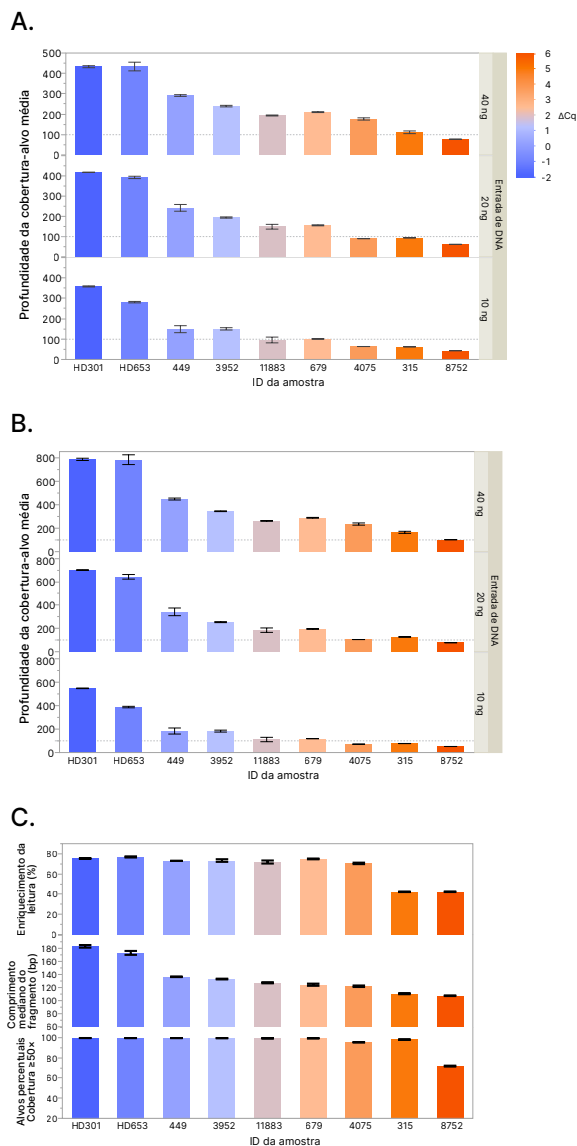


Figura 2: métricas de desempenho para bibliotecas preparadas com base em amostras FFPE usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Foram preparadas bibliotecas em triplicata usando DNA extraído de linhagens celulares FFPE (HD301 e HD653) e tecidos FFPE de tumores de mama, cólon e pulmão de qualidade e valores de entrada variáveis (10 ng, 20 ng e 40 ng). As amostras são representadas graficamente da esquerda para a direita em ordem de qualidade decrescente, conforme indicado pelo valor de  $\Delta Cq$ , sendo as amostras indicadas em azul de qualidade mais alta e as indicadas em vermelho de qualidade mais baixa. As bibliotecas foram enriquecidas com um painel de 2.000 kb de ssDNA de 80 bp e sequenciadas no NextSeq 550 System a  $2 \times 149$  bp. A cobertura-alvo média foi avaliada em duas profundidades de leitura, (A) 10 milhões e (B) 20 milhões de clusters. (C) Métricas de desempenho de biblioteca adicionais para amostras FFPE. Os dados mostrados correspondem a DNA de entrada de 20 ng e 20 milhões de clusters.

## Detecção sensível de variantes de baixa frequência

A sensibilidade do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit para a detecção de variantes de nucleotídeo único (SNVs, single nucleotide variants) e mutações de inserção e deleção (indel, insertion and deletion) foi determinada usando uma linhagem celular FFPE personalizada portando variantes associadas ao câncer (FFPE TST Custom DNA<sub>v2</sub>, SeraCare). O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment demonstrou sensibilidade analítica elevada, com a capacidade de detectar ~90% das SNVs com frequência alélica da variante (VAF) entre 1% e 2% (Figura 3, Tabela 3). A sensibilidade de detecção de indels com VAF acima de 2% foi >80% (Figura 3, Tabela 3).

## Compatibilidade com formatos de enriquecimento 1-plex e 4-plex

Métricas de desempenho comparáveis, incluindo a profundidade da cobertura-alvo média, percentuais de alvos com cobertura  $\geq 50x$  e enriquecimento percentual da leitura, foram atingidas para formatos de enriquecimento 1-plex e 4-plex em amostras com qualidade variável  $\Delta Cq$  1,5 a 4,2 (Figura 4).

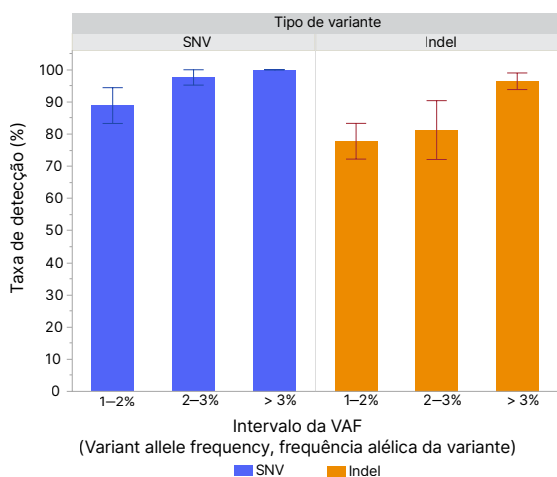


Figura 3: detecção de variantes em frequências alélicas baixas. As variantes foram diluídas em pelo menos três níveis de frequências alélicas-alvo com DNA FFPE de uma amostra de linhagem celular do tipo selvagem (GM24385). Seis réplicas de bibliotecas foram preparadas com DNA de entrada de 10 ng por nível de frequência alélica e enriquecidas com um painel de 2.000 kb de ssDNA de 80 bp seguindo o fluxo de trabalho de enriquecimento 1-plex. As bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 550 System com  $2 \times 149$  bp. As leituras de sequenciamento foram subamostradas para 20 milhões de clusters. A taxa de detecção (n/6) para cada tipo de variante em diferentes intervalos de VAF foi avaliada.

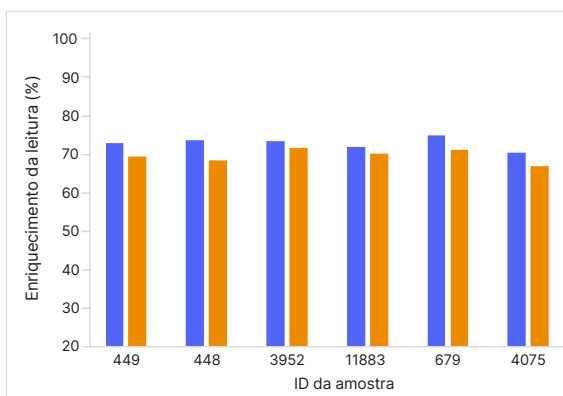
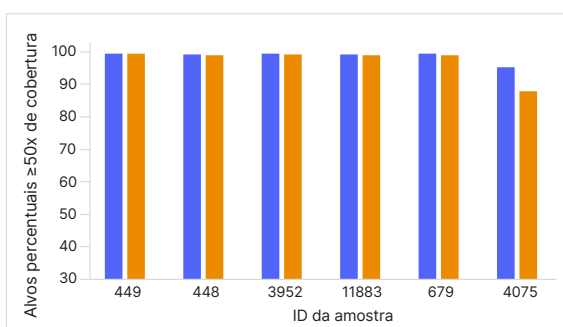
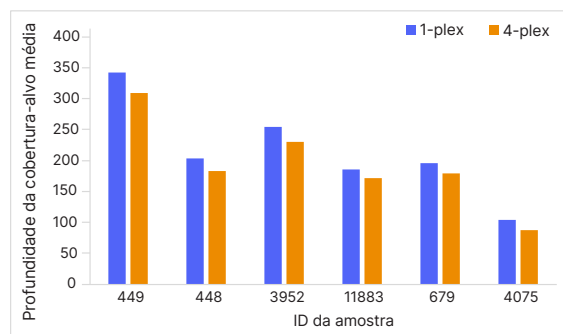


Figura 4: métricas de desempenho em formatos de enriquecimento 1-plex e 4-plex. Bibliotecas de amostras de tecido de DNA FFPE (DNA de entrada de 20 ng) de  $\Delta Cq$  diferentes foram individualmente enriquecidas com um painel de 2.000 kb de ssDNA de 80 bp (1-plex, barras azuis). As mesmas bibliotecas foram enriquecidas novamente com o mesmo painel seguindo o formato de enriquecimento multiplex (4-plex, barras laranja). As bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 550 System a  $2 \times 149$  bp e as leituras de sequenciamento foram subamostradas para 20 milhões de clusters.

Tabela 3: resumo de variantes somáticas individuais detectadas usando Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

ID do banco de dados COSMIC	Gene	Tipo de variante	Substituição de aminoácido	VAF detectada (%) <sup>a</sup>	N.º de réplicas detectadas <sup>b</sup>
COSV51614178	<i>MLH1</i>	SNV	p.V384D	2,0	6
COSV57169334	<i>MYD88</i>	SNV	p.L273P	2,3	6
COSV58963463	<i>CSF3R</i>	SNV	p.T618I	2,6	6
COSV55545304	<i>KRAS</i>	SNV	p.K117N	2,9	6
COSV50630049	<i>CBL</i>	SNV	p.L380P	2,9	5
COSV61615239	<i>IDH1</i>	SNV	p.R132H	3,0	5
COSV52274101	<i>MSH6</i>	SNV	p.E1322*	3,5	6
COSV59205440	<i>SF3B1</i>	SNV	p.G742D	3,9	6
COSV56057713	<i>BRAF</i>	MNV	p.V600K	2,1	6
COSV64288359	<i>PTEN</i>	Del	p.C250Wfs*2	2,3	6
COSV56542602	<i>VHL</i>	Del	p.P99Qfs*60	2,5	6
COSV52740986	<i>TP53</i>	Del	p.K291Tfs*48	2,7	6
COSV55388067	<i>KIT</i>	Del	p.W557_E561del	3,2	5
COSV61376874	<i>ARID1A</i>	Del	p.A339Lfs*24	3,2	6
COSV62688630	<i>CTNNB1</i>	Del	p.S45del	4,7	6
COSV67575778	<i>JAK2</i>	Del	p.N542_E543del	5,3	5
COSV56060749	<i>BRAF</i>	Ins	p.T599dup	1,9	6
COSV55386625	<i>KIT</i>	Ins	p.A502_Y503dup	2,8	6
COSV64290304	<i>PTEN</i>	Ins	E242Lfs*15	3,1	6
COSV51766549	<i>EGFR</i>	Ins	p.A767_V769dup	3,5	6
COSV51772596	<i>EGFR</i>	Ins	p.N771_H773dup	3,6	6
COSV57195669	<i>CEBPA</i>	Ins	p.H24Afs*84	5,0	6

a. Média de réplicas detectadas.  
b. De um total de seis réplicas.

## Excelente desempenho da biblioteca com Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit com o Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel gerou consistentemente bibliotecas de comprimento >150 bp com base em linhagens celulares FFPE (Figura 5). Foram atingidas métricas de alto desempenho para todas as bibliotecas preparadas com entrada  $\geq 20$  ng, incluindo enriquecimento da leitura, porcentagem de leituras alinhadas e uniformidade de cobertura. As métricas de desempenho foram comparáveis entre bibliotecas enriquecidas como 1-plex e 4-plex.

## Detecção sensível de variantes com o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment

O impacto da profundidade de sequenciamento na cobertura-alvo média e na detecção de variantes foi avaliado para bibliotecas enriquecidas usando o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment. Os resultados demonstram que foi atingida uma cobertura-alvo média de até 500 $\times$  quando oito bibliotecas de exoma foram sequenciadas em uma cavidade da lâmina de fluxo S4 do NovaSeq 6000 (Figura 6). Quando as leituras de sequenciamento foram subamostradas para um total de 200 milhões e 400 milhões de leituras de filtro de passagem, as bibliotecas atingiram uma cobertura-alvo média de  $\sim 150\times$  e  $\sim 300\times$ , respectivamente, independentemente dos valores de entrada e da plexação de enriquecimento.

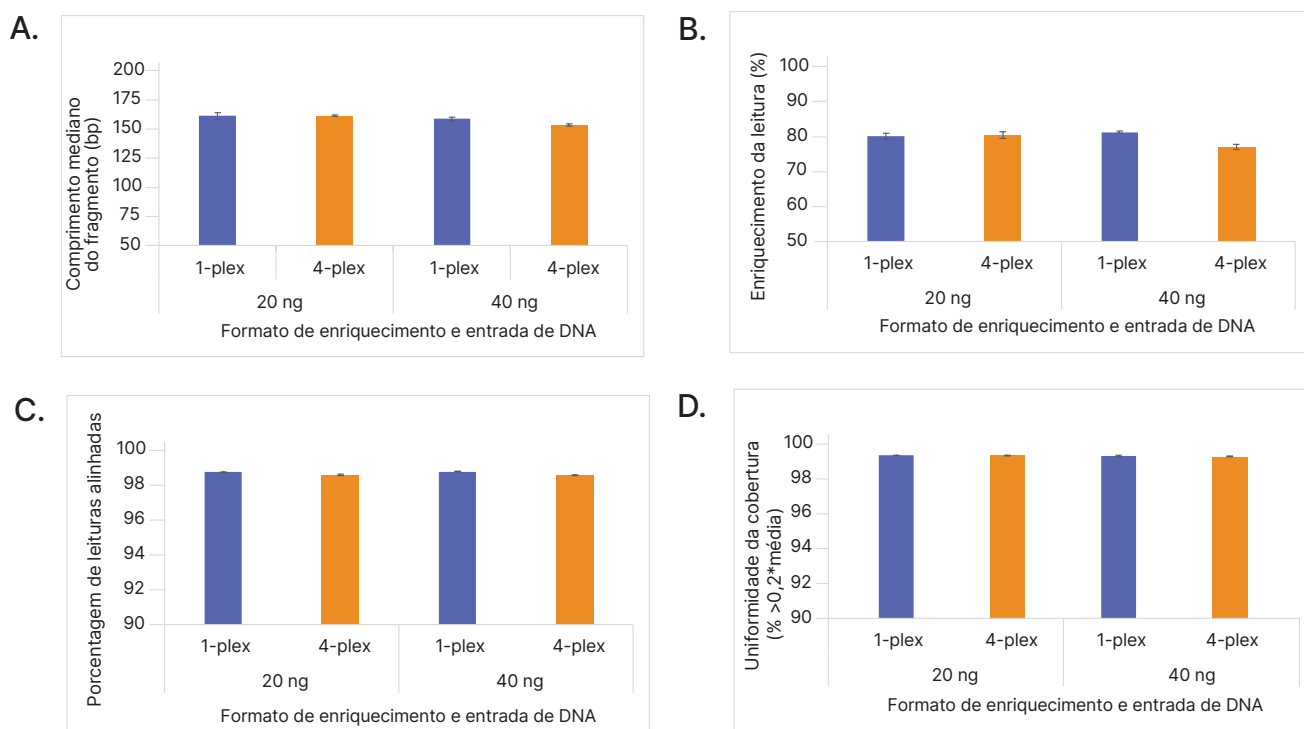


Figura 5: métricas de desempenho de biblioteca com painel Illumina Exome 2.5 Enrichment. Quatro réplicas de bibliotecas foram preparadas usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment com base em uma linhagem celular FFPE padronizada portando variantes associadas ao câncer (FFPE TST Custom DNAm2, SeraCare). As variantes foram diluídas em uma frequência alélica-alvo de  $\sim 2\%$  e as bibliotecas foram preparadas com DNA de entrada de 20 ng ou 40 ng. O enriquecimento foi realizado com o Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel seguindo o fluxo de trabalho de enriquecimento 1-plex ou 4-plex para sondas de dsDNA no guia do usuário do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Oito bibliotecas enriquecidas usando o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment foram sequenciadas para cada cavidade S4 no NovaSeq 6000 System a  $2 \times 151$  bp. Os dados de sequenciamento foram subamostrados para 200 milhões de clusters (ou um total de 400 milhões de leituras de filtro de passagem) e as métricas de desempenho das bibliotecas foram comparadas entre duas entradas.

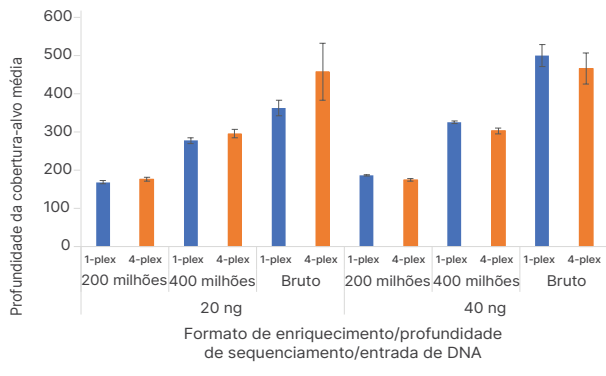
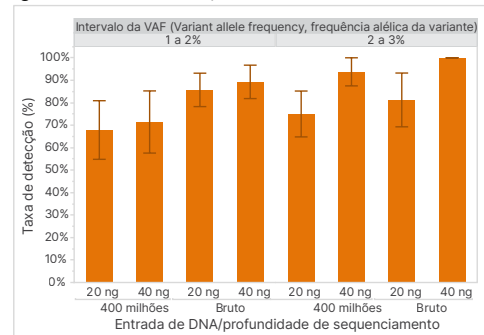


Figura 6: cobertura-alvo média atingida com o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment. Quatro réplicas de bibliotecas foram preparadas usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment com base em DNA de 20 ng ou 40 ng derivado de uma linhagem celular FFPE padronizada portando variantes associadas ao câncer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). As variantes foram diluídas em uma frequência alélica-alvo de ~2%. O enriquecimento foi realizado com o Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel seguindo o fluxo de trabalho de enriquecimento 1-plex (barras azuis) ou 4-plex (barras laranja) para sondas de dsDNA. Oito bibliotecas foram sequenciadas para cada cavidade S4 no NovaSeq 6000 System a 2 × 151 bp. Os dados de sequenciamento foram subamostrados para 100 ou 200 milhões de clusters (um total de 200 ou 400 milhões de leituras de filtro de passagem) e as métricas de desempenho das bibliotecas foram avaliadas. As leituras brutas variaram de 296 a 417 milhões de clusters (um total de 592 a 834 milhões de leituras de filtro de passagem) para bibliotecas enriquecidas de 1-plex ou 319 a 544 milhões de clusters (um total de 638 milhões a 1,08 bilhão de leituras de filtro de passagem) para bibliotecas enriquecidas de 4-plex.

Bibliotecas submetidas a multiplexação (4-plex) preparadas usando o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment atingiram sensibilidade de 80% para SNVs com VAF entre 2% e 3% quando as leituras das bibliotecas de 20 ng foram subamostradas para 200 milhões de clusters. A taxa de detecção de SNVs melhorou com uma entrada de 40 ng ou com sequenciamento mais profundo, particularmente para variantes com VAF no intervalo entre 1% e 2% (Figura 7A). Bibliotecas submetidas a multiplexação preparadas usando o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment atingiram sensibilidade de 80% a 90% para indels com VAF entre 2% e 3%, dependendo do valor da entrada e da profundidade do sequenciamento. Para VAF acima de 3%, 100% dos indels foram detectados com valores de entrada de 20 ng e 40 ng (Figura 7B).

### A. Detecção de SNV (single nucleotide variant, variante de nucleotídeo único)



### B. Detecção de indel

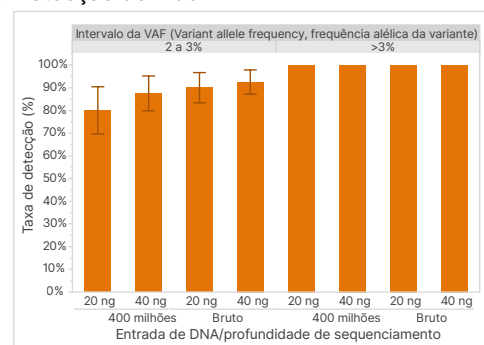


Figura 7: detecção de variante somática com o painel Illumina Exome 2.5 Enrichment. Quatro réplicas de bibliotecas foram preparadas usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment com base em DNA de 20 ng ou 40 ng derivado de uma linhagem celular FFPE padronizada portando variantes associadas ao câncer (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). As variantes foram diluídas em uma frequência alélica-alvo de ~2%. O enriquecimento foi realizado com o Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel seguindo o fluxo de trabalho de enriquecimento 4-plex para sondas de dsDNA. Oito bibliotecas foram sequenciadas para cada cavidade S4 no NovaSeq 6000 System a 2 × 151 bp. Os dados de sequenciamento foram subamostrados para 200 milhões de clusters (um total de 400 milhões de leituras de filtro de passagem) e as métricas de desempenho das bibliotecas foram avaliadas. As leituras brutas variaram de 319 milhões a 544 milhões de clusters (um total de 638 milhões a 1,08 bilhão de leituras de filtro de passagem) para bibliotecas enriquecidas.



## Resumo

A preparação de bibliotecas da alta qualidade com base em DNA FFPE é um fator essencial no desempenho da caracterização molecular de tumores baseada em NGS. Esta nota de aplicação demonstra o excelente desempenho do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment na preparação de bibliotecas prontas para sequenciamento com base em DNA extraído de amostras FFPE, produzindo dados precisos para a identificação de variantes somáticas e análise posterior. Este versátil kit de preparação de bibliotecas é compatível com painéis de enriquecimento fornecidos pelo usuário até o tamanho de exoma e fornece portabilidade de conteúdo, permitindo que os laboratórios personalizem o design experimental com base nas necessidades de pesquisa deles.

## Saiba mais

[Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

[DRAGEN Enrichment App](#)

[DRAGEN recipe for analyzing FFPE sample libraries prepared using Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

## Referência

1. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61(1):64-71. doi:10.1373/clinchem.2014.223040



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-02524 PTB v1.0