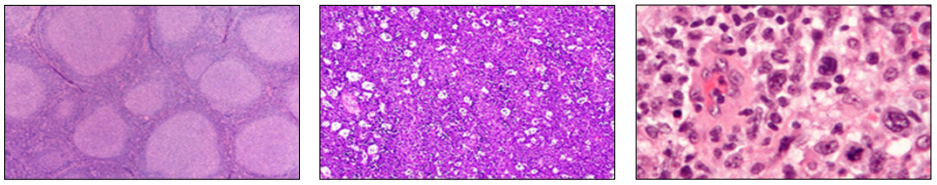
PREPARAZIONE DELLA LIBRARY PER SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS): CONFRONTO TRA APPROCCIO MANUALE ED AUTOMATIZZATO

Re C, Sanzogni A, Medicina D, Mandelli GE, Balzarini P, Lorenzi L

Cattedra di Anatomia Patologica – Università degli Studi Brescia – ASST Spedali Civili di Brescia

INTRODUZIONE

Next Generation Sequencing (NGS) è una tecnica di indagine molecolare che consente di sequenziare acidi nucleici con elevata sensibilità e specificità. Recentemente si sono resi disponibili pannelli targeted disegnati per rilevare mutazioni su geni associati alla linfomagenesi, B e T, con scopo diagnostico e prognostico.



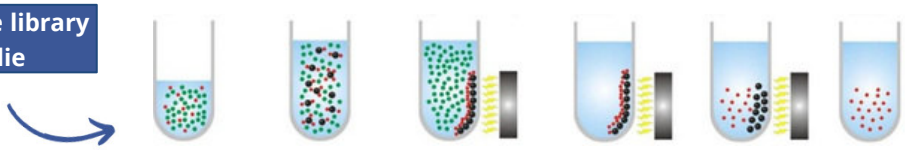
SCOPO

Confrontare i parametri di qualità del sequenziamento ottenuto con un pannello NGS targeted per linfomi, applicando due approcci di preparazione delle library: Manuale e Automatizzata.

MATERIALI E METODI

- Revisione istopatologica
- Selezione dei casi di linfoma adeguati per NGS
- Estrazione del DNA

Cattura delle library con biglie



- Preparazione della libreria di sequenziamento on con modalità Manuale nel Pool1, in modalità Automatizzata (Preparatore automatizzato Hamilton)
- Sequenziamento Capture-based su Illumina Next-Seq 500: pannello NGS targeted a DNA (73 geni, Sophia Genetics) effettuato su due Pool; ciascuno di 12 casi (24 casi in totale)
- Revisione dei file QA (Quality Assessment) dei due Pool, ottenuti dall'analisi bioinformatica effettuata dal software

RISULTATI

- **Conta globale delle letture: mediamente sono state generate più reads nel Pool con approccio manuale (137.700.486 vs 125.557.116).**

Considerando entrambi i Pool, il confronto di numero di reads generate da campioni a diversa condizione preanalitica ha mostrato che il DNA estratto da i campioni freschi congelati hanno consentito di ottenere un maggior numero di reads (media: 13.07 vs 11.80, p: 0.006). Questo potrebbe giustificare la differenza tra I due Pool che avevano diverso numero di casi non fissati (2 vs 0).

- ***On & Off Targets*: la % di sequenze *on-targets* è risultata lievemente più alta nel Pool con approccio automatizzato (media: 86.04% vs 89.17%);**
- **Copertura del target: il *coverage è risultato* ottimo con entrambi gli approcci (media a 1000x: 99.60% vs 99.65%).**
- **Qualità di mappaggio: con entrambi gli approcci è stato raggiunto un Phred score di 60 complessivo**

CONCLUSIONI e DISCUSSIONE

➢ Questa valutazione descrittiva ha mostrato buona performance di sequenziamento in un nuovo pannello di analisi mutazionale per Linfomi sia con l'approccio di preparazione della library manuale che con quello automatizzato.

➢ Parametri di qualità di alta performance sono stati ottenuti sia da campioni freschi che da tessuti fissati in formalina, incluse biopsie osteomidollari decalcificate con EDTA.

➢ A parità di performance, il protocollo automatizzato risulta nel complesso preferibile al metodo manuale in quanto reduce l'"*hands-on-time*" garantendo più spazi pratici al personale tecnico, consente di standardizzare la procedura ed è molto utile in contesti con alti volumi di casistica, come le *facilities*.