

Genaueres,
IVDR-konformes
Varianten-Calling
mit Illumina
DRAGEN™ Server
for NextSeq™
550Dx Instruments



Einleitung

NGS-Anwendungen (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) sind unerlässlich für umfassende Diagnostiktests, beispielsweise Neugeborenen-Screenings, Tests auf genetische Erkrankungen und Tests in der Onkologie. NGS-Diagnoseassays müssen von Laboren einfach eingeführt und verwendet werden können und zudem wichtigen Vorschriften entsprechen, die den maximal möglichen Versorgungsstandard gewährleisten und Patienten schützen sollen.

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments ermöglicht das schnelle und hochpräzise Varianten-Calling für Diagnoseworkflows mit flexibler, gezielter Bibliotheksvorbereitung auf Basis von Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx basiert auf Chemie mit Bead-gebundenen Transposons und stellt eine flexible, einfache und gezielte Anreicherungslösung für den Einsatz in *In-vitro*-Diagnostik-Anwendungen (IVD-Anwendungen) dar. Die Sekundäranalyseanwendung für Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, die auf Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments ausgeführt wird, entspricht in Bezug auf die Integration in Diagnoseworkflows der Verordnung über *In-vitro*-Diagnostika (IVDR, *In Vitro* Diagnostics Regulation) 2017/746 der Europäischen Union (EU).

Im vorliegenden Anwendungshinweis wird eine DNA-zu-Daten-Lösung präsentiert, die die Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Bibliotheksvorbereitung mit der Sequenzierung auf dem NextSeq 550Dx Instrument und der Sekundäranalyse mithilfe der Anreicherungsanwendung von Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments kombiniert ([Abbildung 1](#)). Die moderne grafische Benutzeroberfläche für Illumina Run Manager auf Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments ermöglicht die anwenderfreundliche Einrichtung von Sequenzierungsläufen, die automatisierte Sekundäranalyse der Daten sowie eine schnelle, effiziente und verlustfreie Original Read Archive(ORA)-Datenkomprimierung.¹

Darüber hinaus reduziert die direkte Integration in das NextSeq 550Dx Instrument die Bedienung auf einen einzigen Touchpoint bei der Laufeinrichtung und verkürzt die Gesamtdauer bis zur Verfügbarkeit der Ergebnisse. Diese Lösung liefert hochwertige Sequenzierungsdaten und zeichnet sich durch einen genauen Nachweis von Keimbahn- und somatischen Varianten in Diagnostiktests aus.

Methoden

Probenvorbereitung

Zur Auswertung des Keimbahnvarianten-Callings wurde genomische DNA (gDNA) aus Referenzproben des Coriell Institute (Katalog-Nr. NA24631, NA24385, NA12877 und NA12878) extrahiert. Für die Auswertung des Callings somatischer Varianten wurden acht DNA-Replikate extrahiert und mit Kontrollproben von SeraCare vorbereitet.

Bibliotheksvorbereitung

Die Bibliotheken wurden mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx und UD Indexes Set A (Illumina, Katalog-Nr. 20051352) anhand einer Zugabe von 50 ng DNA für den Nachweis von Keimbahn- und somatischen Varianten vorbereitet. Die Target-Anreicherung erfolgte mit einem Exompanel und einem Panel für über 500 Krebsgene.

Sequenzierung

Die Sequenzierung auf dem NextSeq 550Dx Instrument wurde mit Illumina Run Manager konfiguriert. Die Software ist im Lieferumfang von Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments enthalten. Die vorbereiteten Bibliotheken wurden auf dem NextSeq 550Dx Instrument im IVD-Modus mit dem High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) IVD (Illumina, Katalog-Nr. 20028871) sequenziert. Die Länge der Paired-End-Reads betrug 2×151 bp.



Abbildung 1: Genauer und effizienter IVDR-konformer Workflow mit Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments.

Datenanalyse

Die Datenanalyse mit der App DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wurde während der Planung des Sequenzierungslaufs mit Illumina Run Manager konfiguriert und nach Abschluss des Sequenzierungslaufs automatisch gestartet. Dank dieser Konfiguration mit einem einzigen Touchpoint entfallen die manuellen Schritte zum Start der Sekundäranalyse nach der Sequenzierung. Nach Beginn der Analyse ist das NextSeq 550Dx Instrument bereit für den nächsten Sequenzierungslauf ([Abbildung 2](#)).

Die Laufzeiten der Analyseanwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wurden anhand von Daten getestet, die mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) IVD (Illumina, Katalog-Nr. 20028871) generiert wurden. Die Laufzeitanalyse umfasste die FASTQ-Generierung, die ORA-Komprimierung, das Mapping/Alignment und das Varianten-Calling. Die FASTQ-Dateien wurden mit DRAGEN Ora Compression komprimiert, was die Dateigröße etwa bis um den Faktor 5 verkleinert, die Dateiübertragung beschleunigt und die Datenspeicher- und Stromkosten reduziert.

Zur Bestimmung der Genauigkeit des Varianten-Callings und für den Laufzeitvergleich wurden Proben mit BWA-MEM (0.7.17)² aligniert, mit SAMtools (1.15.1)³ sowie Picard (2.27.5)⁴ verarbeitet und mit GATK 4.3.0⁵ analysiert. Die Genauigkeit des Varianten-Callings wurde mit dem Illumina Variant Calling Assessment Tool (VCAT 4.1.0) durch Vergleich der einzelnen Proben mit einem Referenzsatz bewertet. Die Analyse wurde auf einem Hochleistungscomputercluster mit CPU-Knoten mit für die Analyse optimiertem Multithreading durchgeführt.

Ergebnisse

Die Daten zeigen, dass die Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx eine hochwertige Analyse von Sequenzierungsdaten und einen genauen Nachweis von Varianten liefert. Die Performance übertrifft hierbei die der bewährten BWA-GATK-Analysepipeline ([Tabelle 1](#)). Die in der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx enthaltene verlustfreie ORA-Komprimierung konnte die Dateigröße erheblich reduzieren ([Tabelle 2](#)), was deutliche Einsparungen bei den Kosten für Datenspeicherung und Stromverbrauch ermöglicht. Die Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Keimbahnanalyse mit oder ohne ORA-Komprimierung erfolgt darüber hinaus in einem Bruchteil der für die BWA-GATK-Analyse erforderlichen Zeit ([Abbildung 3](#)).

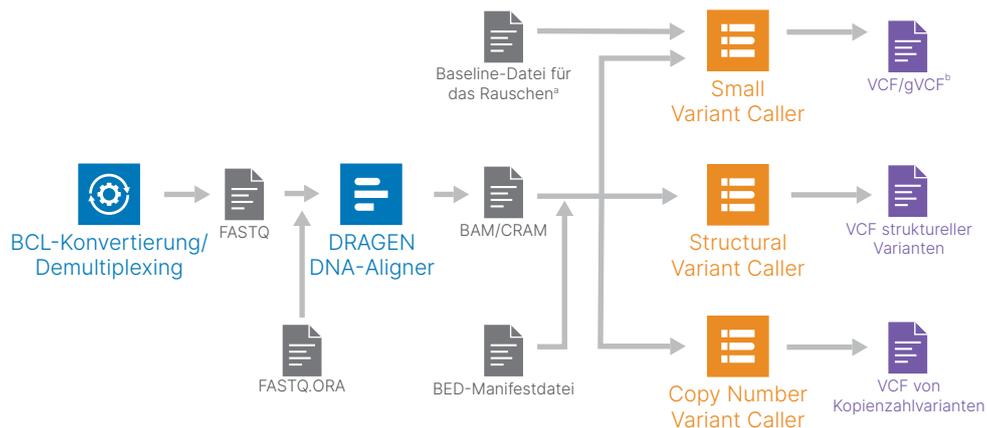


Abbildung 2: Workflow der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx: Die Analyse kann in Illumina Run Manager so konfiguriert werden, dass diese automatisch nach Abschluss des Sequenzierungslaufs beginnt. Der Workflow umfasst die Generierung von FASTQ-Dateien, das Mapping/Alignment sowie das Calling von Keimbahn- und somatischen Varianten. Die extrem effiziente ORA-Komprimierung reduziert die Größe von FASTQ-Dateien bis max. Faktor 5.

- Mithilfe der DRAGEN Baseline Builder-App lässt sich eine optionale anwendungsspezifische Baseline-Datei für das Rauschen erstellen, die im Modus für somatische Varianten verwendet wird.
- Beim Calling somatischer Varianten werden keine gVCF-Dateien generiert.

Tabelle 1: Vergleich der Genauigkeit des Keimbahn-Varianten-Callings im IVD-Modus

| Pipeline | SNV-Präzision | SNV-Recall | SNV F1 | Indel-Präzision | Indel-Recall | Indel F1 |
|---|---------------|------------|---------|-----------------|--------------|----------|
| BWA-GATK | 97,36 % | 93,95 % | 95,62 % | 65,29 % | 79,83 % | 71,78 % |
| Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx | 99,14 % | 95,85 % | 97,46 % | 90,12 % | 85,43 % | 87,70 % |

Tabelle 2: Performance der ORA-Komprimierung in der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Panelgröße | FASTQ-Dateigröße (GB) | |
|----------------------|-----------------------|-----------|
| | Fastq.gz ^a | Fastq.ora |
| Großes Panel (45 MB) | 86,8 GB | 25,7 GB |

a. Qzip ist ein alternatives Komprimierungstool für die Ausgabe von Sequenzdaten im QZ-Format.

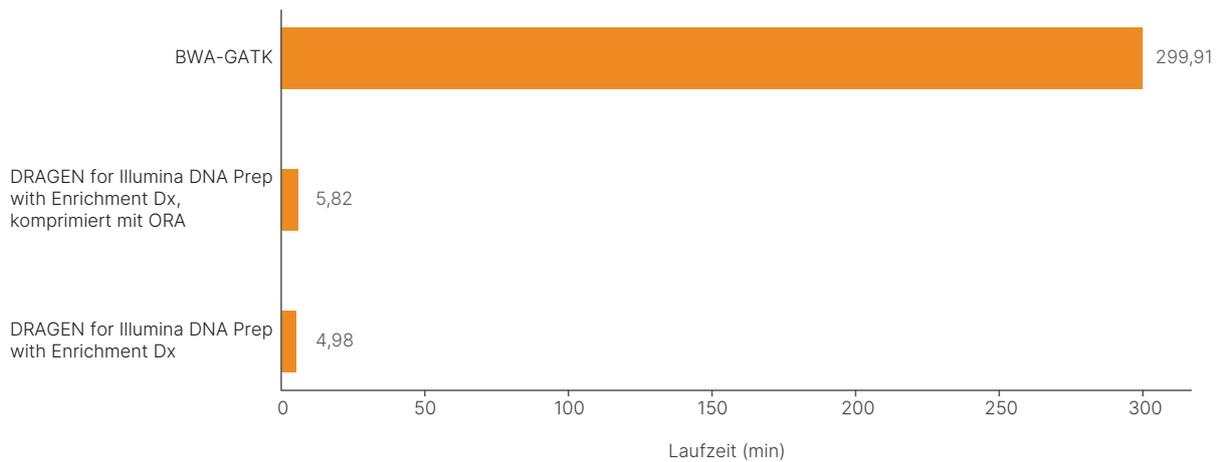


Abbildung 3: Laufzeitvergleich zwischen einem Lauf mit DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx auf Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments und der BWA-GATK-Analyse auf einer Hochleistungscomputing-Plattform mit 16 Kernen: Dargestellt werden die durchschnittlichen Laufzeiten für die Keimbahnanalyse von acht Proben. Die Sequenzierungsdaten wurden mit einem Exompanel mit 42,5 Mb und einer 200-fachen Read-Tiefe generiert.

Zusammenfassung

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments erweitert und vereinfacht das Angebot von Illumina für die IVD-NGS durch die integrierte Sekundäranalyse mithilfe leistungsstarker und intuitiver DRAGEN-Software. Der Server enthält Illumina Run Manager zur Kopplung mit dem NextSeq 550Dx Instrument, sodass Anwender den Sequenzierungslauf und die Sekundäranalyse gemeinsam mit dem Lauf konfigurieren können, was dank der geringeren Anzahl an Touchpoints potenzielle Bedienungsfehler auf ein Minimum reduziert.

Die Analyse startet im Anschluss an den Sequenzierungslauf automatisch und das Gerät steht unmittelbar für einen weiteren Sequenzierungslauf zur Verfügung, was Ausfallzeiten minimiert. In Kombination mit der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx für die Sekundäranalyse ermöglicht Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments Diagnoselaboren die optimierte, genaue und IVDR-konforme Sekundäranalyse für das Varianten-Calling.

Bestellinformationen

| Produkt | Katalog-Nr. |
|---|-------------|
| DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments | 20086130 |
| NextSeq 550Dx Instrument | 20005715 |

Weitere Informationen

[DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments](#)

[NextSeq 550Dx Instrument](#)

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

[Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

[Verordnung \(EU\) 2017/746 über *In-vitro*-Diagnostika](#)

Quellen

1. Illumina. Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Sequencing Instruments data sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-ivd-server-data-sheet-m-gl-01471/dragen-ivd-server-data-sheet-m-gl-01471.pdf. Veröffentlicht [ausstehend]. Aufgerufen am [ausstehend].
2. Li H, Durbin R. [Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform](#). *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
3. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. [Twelve years of SAMtools and BCFtools](#). *Gigascience*. 2021;10(2):giab008. doi:10.1093/gigascience/giab008
4. Broad Institute. Picard. <https://broadinstitute.github.io/picard/>. Aufgerufen am 12. Dezember 2023.
5. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. [The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data](#). *Genome Res*. 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110
6. Illumina. Variant Calling Assessment Tool. www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/variant-calling-assessment-tool.html. Aufgerufen am 12. Dezember 2023.

Erklärungen zur bestimmungsgemäßen Verwendung

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (USA)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx besteht aus einem Satz Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus DNA verwendet werden, die aus peripherem Vollblut und formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe gewonnen wurde. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Anwender bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenziersystemen von Illumina vorgesehen.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (CE-IVD)

Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit enthält Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus genomischer DNA, die aus humanen Zellen und humanem Gewebe zur Entwicklung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays gewonnen wurde. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Anwender bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenziersystemen von Illumina vorgesehen. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx enthält Software für die Einrichtung, Überwachung und Analyse von Sequenzierumläufen.

NextSeq 550Dx Instrument (USA)

Das NextSeq 550Dx Instrument ist für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, wenn sie für *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) auf dem Gerät verwendet werden. Die genomische DNA wird aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) gewonnen. Das NextSeq 550Dx Instrument ist nicht für die Genom- oder *De-novo*-Sequenzierung vorgesehen. Auf dem NextSeq 550Dx Instrument dürfen nur registrierte und gelistete, freigegebene oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden.

NextSeq 550Dx Instrument (Europäische Union/andere Länder)

Das NextSeq 550Dx Instrument ist für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, wenn sie für *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) auf dem Gerät verwendet werden. Die genomische DNA wird aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) gewonnen.

Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles) (European Union)

Das Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles) ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung von Probenbibliotheken bei Verwendung von validierten Assays. Das Kit ist zur Verwendung mit dem NextSeq 550Dx Instrument und Analysesoftware vorgesehen.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01470 DEU v1.0