

Llamada de variantes para NGS precisa y compatible con IVDR con el uso de Illumina DRAGEN™ Server for NextSeq™ 550Dx Instruments



Introducción

Las aplicaciones de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) son una parte indispensable para realizar pruebas diagnósticas, como el cribado de recién nacidos, las pruebas de enfermedades genéticas y las pruebas oncológicas. Los ensayos de NGS de diagnóstico deben ser fáciles de adoptar y usar para los laboratorios y deben cumplir las normativas esenciales diseñadas para garantizar el máximo estándar de atención y proteger a los pacientes.

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments permite una llamada de variantes rápida y de alta precisión para flujos de trabajo de diagnóstico mediante la preparación flexible de librerías selectivas Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Por medio de la química transposómica vinculada por bolas, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ofrece una solución de enriquecimiento selectivo flexible y fácil de usar en aplicaciones de diagnóstico *in vitro* (DIV). La aplicación del análisis secundario para el experimento Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments cumple con el Reglamento sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* (IVDR, *In Vitro* Diagnostic Medical Devices Regulation) 2017/746 de la Unión Europea (UE) para la integración en flujos de trabajo de diagnóstico.

Esta nota de aplicación muestra una solución de ADN a datos que combina la preparación de librerías de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, la secuenciación en el instrumento NextSeq 550Dx y el análisis secundario utilizando la aplicación de enriquecimiento en Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments (figura 1). La interfaz gráfica de usuario avanzada de Illumina Run Manager en el servidor Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments ofrece una configuración

del experimento de secuenciación fácil de usar, un análisis de datos secundario automatizado y una compresión de datos Original Read Archive (ORA) rápida, eficiente y sin pérdidas.¹ Además, la integración directa con instrumentos NextSeq 550Dx reduce las interacciones del usuario a un único punto de contacto en la configuración del experimento y reduce el tiempo total hasta los resultados. Esta solución produce datos de secuenciación de alta calidad y detección precisa de variantes germinales y somáticas en pruebas de diagnóstico.

Métodos

Preparación de muestras

Para la evaluación de la llamada de variantes germinales, se extrajo ADN genómico (ADNg) de muestras de referencia de Coriell Institute (n.º de catálogo NA24631, NA24385, NA12877 y NA12878). Para la evaluación de la llamada de variantes somáticas, se extrajeron ocho réplicas de ADN y se prepararon con muestras de control de SeraCare.

Preparación de librerías

Las librerías se prepararon con Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A (n.º de catálogo de Illumina 20051352) a partir de un aporte de 50 ng de ADN para la detección de variantes germinales y somáticas. El enriquecimiento selectivo se llevó a cabo utilizando un panel de exoma y un panel selectivo de más de 500 genes cancerosos.

Secuenciación

La secuenciación en NextSeq 550Dx Instrument se configuró con Illumina Run Manager incluido en Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments.



Figura 1: Flujo de trabajo preciso y eficiente compatible con IVDR que incorpora Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments.

Las librerías preparadas se secuenciaron en NextSeq 550Dx Instrument en modo de DIV con High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) DIV (Illumina, n.º de catálogo 20028871). La longitud de la lectura «paired-end» fue de 2×151 pb.

Análisis de datos

El análisis de datos con la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se configuró como parte de la planificación del experimento de secuenciación con Illumina Run Manager y se lanzó automáticamente una vez finalizado el experimento de secuenciación. Esta configuración con un único punto de contacto elimina la necesidad de pasos manuales para iniciar el análisis secundario después de la secuenciación. Una vez iniciado el análisis, NextSeq 550Dx Instrument está disponible para el siguiente experimento de secuenciación (figura 2).

Las duraciones del experimento de la aplicación de análisis DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se analizaron utilizando los datos generados con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) DIV (Illumina, n.º de catálogo 20028871). El análisis de la duración del experimento incluyó la generación de FASTQ, la compresión ORA, la asignación/alineación y la llamada de variantes. Los archivos FASTQ se comprimieron mediante compresión DRAGEN ORA, lo que dio como resultado tamaños de archivo hasta casi 5 veces más pequeños, transferencias de archivos más rápidas y menores costes de almacenamiento de datos y energía.

Para la precisión de las llamadas de variantes y la comparación de la duración del experimento, las muestras se alinearon con BWA-MEM (0.7.17),² se procesaron con SAMtools (1.15.1)³ y Picard (2.27.5),⁴ y se analizaron con GATK 4.3.0.⁵ La precisión de las llamadas de variantes se evaluó con Illumina Variant Calling Assessment Tool (VCAT 4.1.0) mediante la comparación de cada muestra con un juego de reglas. El análisis se completó en un grupo informático de alto rendimiento con nodos de CPU con multiproceso optimizado para el análisis.

Resultados

Los datos demostraron que la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produjo un análisis de datos de secuenciación de alta calidad y una detección precisa de variantes que supera el rendimiento observado con el proceso de análisis BWA-GATK establecido (tabla 1). La compresión ORA sin pérdidas incluida en la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produjo una reducción sustancial de los tamaños de archivo (tabla 2), lo que respalda un ahorro significativo en el almacenamiento de datos y los recursos energéticos. Además, el análisis de la línea germinal de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, con o sin compresión ORA, tiene lugar en una fracción del tiempo necesario para el análisis de BWA-GATK (figura 3).

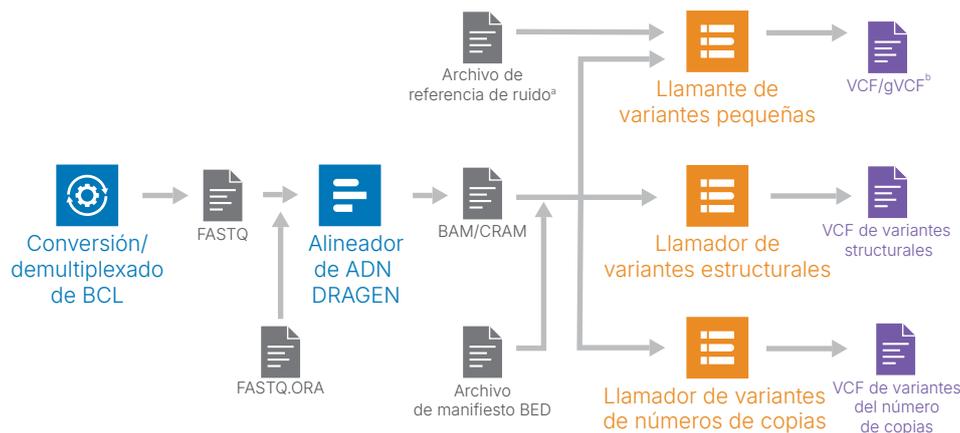


Figura 2: Flujo de trabajo de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx App. El análisis se puede configurar en Illumina Run Manager para que comience automáticamente una vez finalizado el experimento de secuenciación. El flujo de trabajo incluye la generación de archivos FASTQ, la asignación/alineación y la llamada de variantes germinales y somáticas. La compresión ORA excepcionalmente eficiente puede reducir el tamaño de los archivos FASTQ hasta 5 VECES.

- a. La aplicación DRAGEN Baseline Builder se puede usar para crear un archivo de referencia de ruido personalizado opcional para su uso en el modo de variante somática.
b. Los archivos gVCF no se generan con la llamada de variantes somáticas.

Tabla 1: Comparación de la precisión de las llamadas de variantes germinales en modo DIV

Proceso	Precisión de SNV	Retirada de SNV	SNV F1	Precisión de indel	Retirada de indel	Indel F1
BWA-GATK	97,36 %	93,95 %	95,62 %	65,29 %	79,83 %	71,78 %
Aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	99,14 %	95,85 %	97,46 %	90,12 %	85,43 %	87,70 %

Tabla 2: Rendimiento de compresión ORA de la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Tamaño del archivo FASTQ (GB)		
Tamaño de panel	Fastq.gz ^a	Fastq.ora
Panel grande (45 Mb)	86,8 GB	25,7 GB

a. Qzip es una herramienta de compresión alternativa para los archivos de salida de datos de secuencia con formato *.qz.

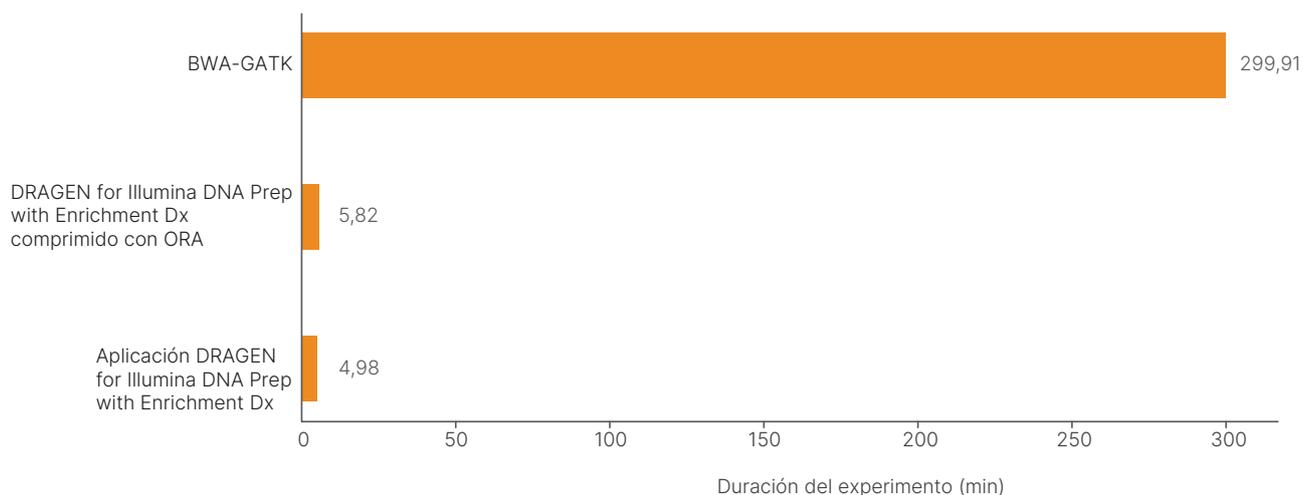


Figura 3: Comparación de la duración del experimento de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments frente al análisis BWA-GATK en una plataforma informática de 16 núcleos y alto rendimiento. Se muestran las duraciones medias del experimento para el análisis germinal de ocho muestras. Los datos de secuenciación se generaron utilizando un panel de exoma de 42,5 Mb con una profundidad de lectura de 200x.

Resumen

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments amplía y simplifica la oferta de DIV de NGS de Illumina con análisis secundarios integrados mediante el potente e intuitivo software DRAGEN. El servidor incluye Illumina Run Manager para emparejarlo con NextSeq 550Dx Instrument, lo que permite a los usuarios configurar el experimento de secuenciación y el análisis secundario como parte de la configuración del experimento, minimizando el posible error del usuario al reducir el número de puntos de contacto. El análisis comienza automáticamente después

del experimento de secuenciación y el instrumento queda inmediatamente disponible para iniciar otro experimento de secuenciación, lo que reduce el tiempo de inactividad. En combinación con la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para el análisis secundario, Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments ofrece a los laboratorios de diagnóstico un análisis secundario optimizado, preciso y compatible con IVDR para la llamada de variantes.

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments	20086130
NextSeq 550Dx Instrument	20005715

Información adicional

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

[NextSeq 550Dx Instrument](#)

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

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

[Reglamento sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* 2017/746 \(UE\)](#)

Bibliografía

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. Fecha de publicación: 2004. Fecha de consulta: mayo de 2004.
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/>. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 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. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2023.

Declaraciones de uso previsto

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Estados Unidos)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx es un juego de reactivos y consumibles usados para preparar librerías de muestras a partir de ADN extraído de sangre completa periférica y de tejido fijado en formol y embebido en parafina. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sondas proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (DIV con certificación CE)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es un juego de reactivos y consumibles usados para preparar librerías de muestras a partir de ADN genómico derivado de células y tejidos humanos para desarrollar ensayos de diagnóstico *in vitro*. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sondas proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx incluye software para la configuración, supervisión y análisis de experimentos de secuenciación.

NextSeq 550Dx Instrument (Estados Unidos)

NextSeq 550Dx Instrument está concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN a partir de ADN genómico humano extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded), cuando se usa para ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) que se realizan en el instrumento. NextSeq 550Dx Instrument no está indicado para la secuenciación del genoma completo ni *de novo*. NextSeq 550Dx Instrument se debe usar con un software de análisis y reactivos de DIV registrados y catalogados, autorizados o aprobados.

NextSeq 550Dx Instrument (Unión Europea/otros)

NextSeq 550Dx Instrument está concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN a partir de ADN genómico humano extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), cuando se usa para ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV) que se realizan en el instrumento.

Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) (Unión Europea)

Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) es un juego de reactivos y consumibles previsto para la secuenciación de librerías de muestras cuando se usa en ensayos validados. El kit está diseñado para usarse con NextSeq 550Dx Instrument y el software de análisis correspondiente.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 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, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-01470 ESP v1.0