

Identificazione  
di varianti mediante  
NGS accurata e  
conforme all'IVDR  
con Illumina  
DRAGEN™ Server  
for NextSeq™  
550Dx Instruments



## Introduzione

Le applicazioni di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) sono indispensabili per i test diagnostici, tra cui lo screening neonatale, i test sulle malattie genetiche e le analisi oncologiche. I saggi di NGS diagnostici devono essere semplici da adottare e da utilizzare da parte dei laboratori e devono essere conformi alle normative previste per proteggere i pazienti e assicurare il più alto livello assistenziale.

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments consente di identificare le varianti in modo rapido e altamente accurato per i flussi di lavoro diagnostici utilizzando la preparazione flessibile delle librerie mirate di Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Basato sulla chimica del trasposoma legato a microsferi, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rappresenta una soluzione di arricchimento mirato facile e flessibile per l'utilizzo nelle applicazioni di diagnostica *in vitro* (IVD, *In Vitro* Diagnostics). L'applicazione di analisi secondaria per la corsa di Illumina DNA Prep with Enrichment Dx su Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments è conforme al regolamento dell'Unione europea (UE) sulla diagnostica *in vitro* (IVDR, *In Vitro* Diagnostics Regulation) 2017/746 per l'integrazione nei flussi di lavoro diagnostici.

Questa nota sull'applicazione mostra una soluzione dal DNA ai dati che combina la preparazione delle librerie di Illumina DNA Prep with Enrichment Dx con il sequenziamento su NextSeq 550Dx Instrument e l'analisi secondaria mediante l'applicazione di arricchimento su Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments (Figura 1). L'interfaccia grafica avanzata per Illumina Run Manager su Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments mette a disposizione degli utenti l'intuitiva configurazione della corsa di sequenziamento, l'analisi secondaria dei dati automatizzata e la compressione dei dati ORA (Original Read Archive) veloce, efficiente e senza perdite.<sup>1</sup> Inoltre, l'integrazione diretta con NextSeq 550Dx

Instruments riduce le interazioni degli utenti a un singolo punto di contatto durante la configurazione della corsa e accorcia i tempi complessivi necessari per ottenere i risultati. Questa soluzione produce dati di sequenziamento di alta qualità e consente il rilevamento accurato delle varianti somatiche e della linea germinale nei test diagnostici.

## Metodi

### Preparazione dei campioni

Per la valutazione dell'identificazione di varianti della linea germinale, il DNA genomico (gDNA, genomic DNA) è stato estratto dai campioni di riferimento del Coriell Institute (n. di catalogo NA24631, NA24385, NA12877 ed NA12878). Per la valutazione dell'identificazione di varianti somatiche, sono stati estratti e preparati otto replicati di DNA utilizzando campioni di controllo di SeraCare.

### Preparazione delle librerie

Le librerie sono state preparate mediante Illumina DNA Prep with Enrichment Dx con UD Indexes Set A (Illumina, n. di catalogo 20051352) a partire da 50 ng di DNA di input per il rilevamento di varianti somatiche e della linea germinale. L'arricchimento del target è stato eseguito utilizzando un pannello dell'esoma e un pannello mirato a oltre 500 geni tumorali.

### Sequenziamento

Il sequenziamento su NextSeq 550Dx Instrument è stato configurato mediante Illumina Run Manager incluso in Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instrument. Le librerie preparate sono state sequenziate su NextSeq 550Dx Instrument in modalità IVD con High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) IVD (Illumina, n. di catalogo 20028871). La lunghezza della lettura paired-end era di 2 × 151 bp.



Figura 1: flusso di lavoro accurato, efficiente e conforme all'IVDR che incorpora Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments.

## Analisi dei dati

L'analisi dei dati con l'app DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è stata configurata nel contesto della pianificazione della corsa di sequenziamento con Illumina Run Manager e lanciata automaticamente una volta completata la corsa di sequenziamento. Questa configurazione con un unico punto di interazione elimina la necessità di passaggi manuali per l'avvio dell'analisi secondaria successivo al sequenziamento. Dopo l'avvio dell'analisi, NextSeq 550Dx Instrument è disponibile per la corsa di sequenziamento successiva (Figura 2).

La durata della corsa per l'applicazione di analisi DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è stata analizzata impiegando i dati generati con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) IVD (Illumina, n. di catalogo 20028871). L'analisi della durata della corsa ha tenuto conto della generazione di FASTQ, della compressione ORA, della mappatura/dell'allineamento e dell'identificazione di varianti. La compressione dei file FASTQ con la tecnologia DRAGEN ORA ha permesso di ridurre le dimensioni fino a cinque volte circa, riducendo di conseguenza la durata del trasferimento dei file stessi nonché i costi energetici e per l'archiviazione dei dati.

Per i confronti riguardanti l'accuratezza dell'identificazione di varianti e la durata della corsa, i campioni sono stati allineati con BWA-MEM (0.7.17),<sup>2</sup> elaborati con SAMtools (1.15.1)<sup>3</sup> e Picard (2.27.5)<sup>4</sup> e analizzati con GATK 4.3.0.<sup>5</sup>

L'accuratezza dell'identificazione di varianti è stata valutata con Illumina Variant Calling Assessment Tool (VCAT 4.1.0) confrontando ciascun campione con un set di verità. L'analisi è stata completata su un cluster di computer ad alte prestazioni con nodi CPU e multithreading ottimizzato per l'analisi.

## Risultati

Dai dati è emerso che l'applicazione DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ha prodotto un'analisi dei dati di sequenziamento di alta qualità e un rilevamento accurato delle varianti, superiore alle prestazioni osservate con la consolidata pipeline di analisi BWA-GATK (Tabella 1). La compressione ORA senza perdita inclusa nell'applicazione DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ha prodotto file di dimensioni notevolmente ridotte (Tabella 2), con conseguenti risparmi significativi a livello di consumi energetici e di costi di archiviazione dei dati. Inoltre, l'analisi della linea germinale con Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, con o senza compressione ORA, avviene in una frazione del tempo necessario per l'analisi con BWA-GATK (Figura 3).

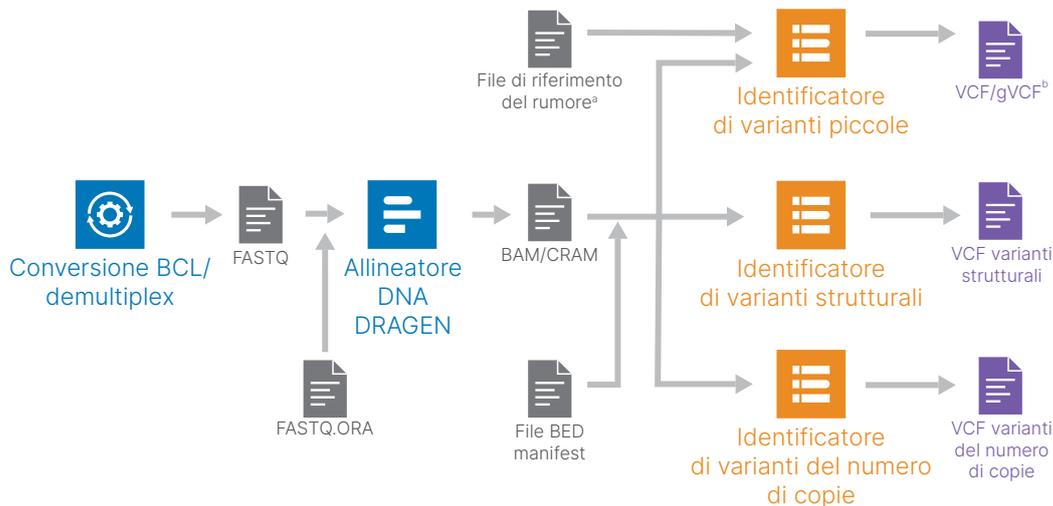


Figura 2: flusso di lavoro dell'app DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. L'analisi può essere configurata in Illumina Run Manager per iniziare automaticamente subito dopo il completamento della corsa di sequenziamento. Il flusso di lavoro include la generazione di file FASTQ, la mappatura/l'allineamento e l'identificazione di varianti somatiche e della linea germinale. La compressione ORA altamente efficiente può ridurre fino a cinque volte le dimensioni dei file FASTQ.

- a. Se lo si desidera, è possibile utilizzare l'app DRAGEN Baseline Builder per creare un file personalizzato di riferimento del rumore da utilizzare solo in modalità variante somatica.  
 b. I file gVCF non vengono generati con l'identificazione di varianti somatiche.

Tabella 1: confronto dell'accuratezza dell'identificazione di varianti della linea germinale in modalità IVD

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

Tabella 2: prestazioni della compressione ORA dell'applicazione DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Dimensione dei file FASTQ (GB)		
Dimensioni del pannello	Fastq.gz <sup>a</sup>	Fastq.ora
Pannello grande (45 Mb)	86,8 GB	25,7 GB

a. Qzip è uno strumento di compressione alternativo per i dati di sequenziamento, che genera file nel formato \*.qz.

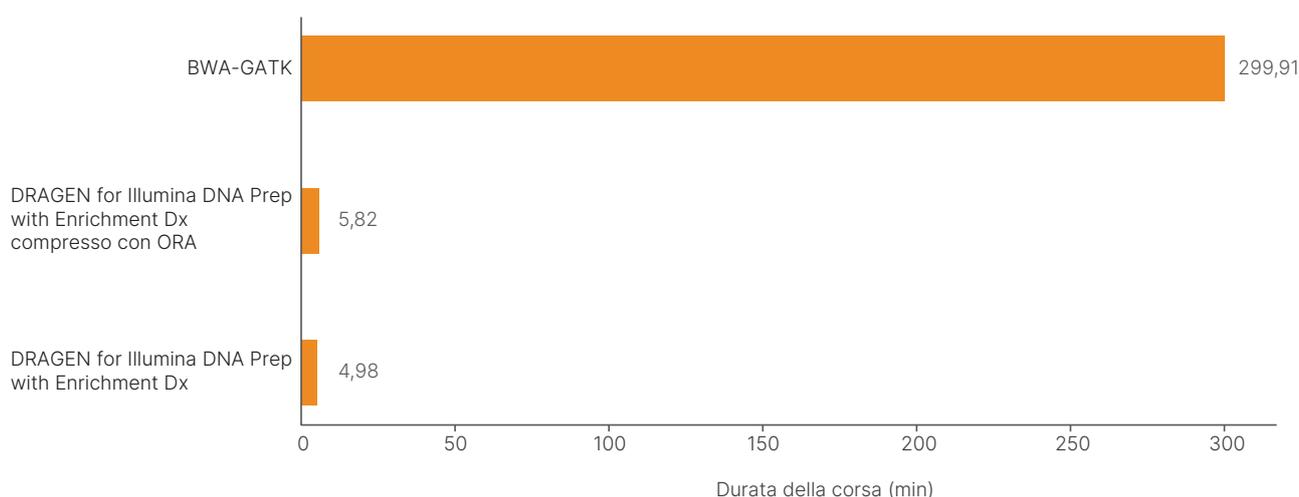


Figura 3: confronto della durata della corsa di DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx su Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments con la durata dell'analisi di BWA-GATK su una piattaforma di calcolo a 16 core e ad alte prestazioni. È mostrata la durata media della corsa per l'analisi della linea germinale di otto campioni. I dati di sequenziamento sono stati generati utilizzando un pannello dell'esoma di 42,5 Mb con profondità di lettura di 200x.

## Riepilogo

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments amplia e semplifica l'offerta di NGS IVD di Illumina integrando l'analisi secondaria grazie al potente e intuitivo software DRAGEN. Il server include Illumina Run Manager per l'accoppiamento con NextSeq 550Dx Instrument, che permette agli utenti di configurare la corsa di sequenziamento e l'analisi secondaria nel contesto della configurazione della corsa; ciò consente di ridurre il numero di punti di interazione e di conseguenza il potenziale di errore umano.

L'analisi viene avviata automaticamente dopo la corsa di sequenziamento e lo strumento torna subito disponibile per un'altra corsa di sequenziamento, il che riduce al minimo i tempi di fermo. Insieme all'applicazione DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx per l'analisi secondaria, Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments offre ai laboratori diagnostici una soluzione di analisi secondaria ottimizzata, accurata e conforme all'IVDR per l'identificazione di varianti.

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments	20086130
NextSeq 550Dx Instrument	20005715

## Maggiori informazioni

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

[NextSeq 550Dx Instrument](#)

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

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

[Regolamento \(UE\) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici \*in vitro\*](#)

## Bibliografia

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](https://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). Pubblicato il giorno [in sospeso]. Consultato il giorno [in sospeso].
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/>. Consultato il 12 dicembre 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](https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/variant-calling-assessment-tool.html). Consultato il 12 dicembre 2023.

## Dichiarazioni d'uso previsto

### Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Stati Uniti)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è un set di reagenti e materiali di consumo per preparare le librerie di campioni ottenute da DNA estratto da sangue intero periferico e tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico è necessario l'uso di pannelli sonda forniti dall'utente. Le librerie di campioni ottenute sono destinate all'uso sui sistemi di sequenziamento di Illumina.

### Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (CE-IVD)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit è un set di reagenti e materiali di consumo utilizzato per preparare le librerie di campioni ottenute da DNA genomico proveniente da cellule e tessuti umani allo scopo di sviluppare saggi diagnostici *in vitro*. Per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico è necessario l'uso di pannelli sonda forniti dall'utente. Le librerie di campioni ottenute sono destinate all'uso sui sistemi di sequenziamento di Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx include un software per la configurazione della corsa di sequenziamento, il monitoraggio e l'analisi.

### NextSeq 550Dx Instrument (Stati Uniti)

NextSeq 550Dx Instrument, quando usato per i saggi di diagnostica *in vitro* (IVD) eseguiti sullo strumento, è destinato al sequenziamento mirato delle librerie di DNA ottenute dal DNA genomico umano estratto da sangue intero periferico o da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded). NextSeq 550Dx Instrument non è destinato al sequenziamento dell'intero genoma né al sequenziamento *de novo*. NextSeq 550Dx Instrument deve essere utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati e certificati, autorizzati o approvati.

### NextSeq 550Dx Instrument (Unione europea/ altri territori)

NextSeq 550Dx Instrument, quando usato per i saggi di diagnostica *in vitro* (IVD) eseguiti sullo strumento, è destinato al sequenziamento mirato delle librerie di DNA ottenute dal DNA genomico umano estratto da sangue intero periferico o da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE).

## Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles) (Unione europea)

Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles), quando usato con saggi convalidati, è un set di reagenti e materiali di consumo destinato al sequenziamento di librerie di campioni. Il kit deve essere utilizzato con NextSeq 550Dx Instrument e software analitici.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-01470 ITA v1.0