

Identificação precisa de variantes de NGS compatíveis com IVDR usando o Illumina DRAGEN™ Server for NextSeq™ 550Dx Instruments



Introdução

As aplicações de sequenciamento de última geração (NGS) são uma parte indispensável dos testes de diagnóstico, incluindo triagem de recém-nascidos, testes de doenças genéticas e testes oncológicos. Os ensaios de diagnóstico NGS precisam ser fáceis para os laboratórios adotarem e usarem, e devem estar em conformidade com as regulamentações essenciais projetadas para garantir o mais alto padrão de tratamento e proteger os pacientes.

O Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments permite a identificação rápida e altamente precisa de variantes para fluxos de trabalho de diagnóstico usando a preparação de biblioteca direcionada e flexível do Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Com base na química do transposoma ligado a beads, o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx oferece uma solução de enriquecimento flexível e fácil para uso em aplicações de diagnóstico *in vitro* (IVD). A aplicação de análise secundária para a corrida do Illumina DNA Prep with Enrichment Dx no Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments está em conformidade com a União Europeia (UE), o *In Vitro* Diagnostics Regulation (IVDR) 2017/746 para integração em fluxos de trabalho de diagnóstico.

Esta nota de aplicação demonstra uma solução de DNA para dados que combina o preparo da biblioteca Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, sequenciamento no NextSeq 550Dx Instrument e análise secundária usando a aplicação de enriquecimento no Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments (Figura 1). A interface de usuário gráfica avançada do Illumina Run Manager no Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments oferece configuração de corrida de sequenciamento fácil de usar, análise automatizada de dados secundários e compactação rápida, eficiente e sem perdas de dados do Original

Read Archive (ORA).¹ Além disso, a integração direta com o NextSeq 550Dx Instruments reduz as interações do usuário a um único ponto de contato na configuração de corrida e diminui o tempo geral até os resultados. Essa solução produz dados de sequenciamento de alta qualidade e detecção precisa de variantes somáticas e de linha genética em testes de diagnóstico.

Métodos

Preparação da amostra

Para avaliação da identificação de variantes da linha genética, o DNA genômico (gDNA) foi extraído das amostras de referência do Coriell Institute (n.ºs do catálogo NA24631, NA24385, NA12877 e NA12878). Para avaliar a identificação de variantes somáticas, foram extraídas e preparadas oito réplicas de DNA a partir de amostras de controle do SeraCare.

Preparação de bibliotecas

As bibliotecas foram preparadas com o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A (Illumina, N.º do catálogo 20051352) usando 50 ng de DNA de entrada para detecção de variantes somáticas e de linha genética. O enriquecimento do alvo foi feito utilizando um painel de exoma e outro direcionado a mais de 500 genes relacionados ao câncer.

Sequenciamento

O sequenciamento no NextSeq 550Dx Instrument foi configurado com o Illumina Run Manager incluído no Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments. As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no NextSeq 550Dx Instrument no modo IVD com o High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) IVD (Illumina, N.º do catálogo 20028871). O comprimento da leitura tipo paired-end foi de 2×151 bp.



Figura 1: Fluxo de trabalho preciso e eficiente em conformidade com IVDR que incorpora o Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments.

Análise de dados

A análise de dados com a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foi configurada como parte do planejamento da corrida de sequenciamento com o Illumina Run Manager e iniciada automaticamente após a conclusão da corrida de sequenciamento. Essa configuração com ponto único de contato elimina a necessidade de processos manuais para dar início à análise secundária após o sequenciamento. Após a análise ser iniciada, o NextSeq 550Dx Instrument estará disponível para a próxima corrida de sequenciamento (Figura 2).

Os tempos de corrida da aplicação de análise DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foram testados usando dados gerados com o NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) IVD (Illumina, N.º do catálogo 20028871). A análise do tempo de corrida incluiu geração FASTQ, compactação com ORA, mapeamento/alinhamento e identificação de variantes. Os arquivos FASTQ foram compactados com a DRAGEN Ora Compression, resultando em tamanhos de arquivo até cinco vezes menores, transferências de arquivos mais rápidas e custos reduzidos de armazenamento de dados e energia.

Para a precisão da identificação de variantes e comparação do tempo de corrida, as amostras foram alinhadas com BWA-MEM (0.7.17),² processadas com SAMtools (1.15.1)³ e Picard (2.27.5),⁴ e analisadas com GATK 4.3.0.⁵ A precisão da identificação de variantes foi avaliada com a Illumina Variant Calling Assessment Tool (VCAT 4.1.0) comparando cada amostra com um conjunto de verdades. A análise foi realizada em um cluster de alto desempenho, utilizando nós de CPU com multithreading otimizado para esse tipo de análise.

Resultados

Os dados demonstraram que a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produziu análise de dados de sequenciamento de alta qualidade e identificação precisa de variantes que excedem o desempenho observado com o pipeline de análise BWA-GATK estabelecido (Tabela 1). A compactação com ORA sem perdas incluída na aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produziu tamanhos de arquivo substancialmente reduzidos (Tabela 2), proporcionando economias significativas em armazenamento de dados e recursos de energia. Além disso, a análise da linha genética com o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, com ou sem compactação com ORA, ocorre em uma fração do tempo necessário para a análise com BWA-GATK (Figura 3).

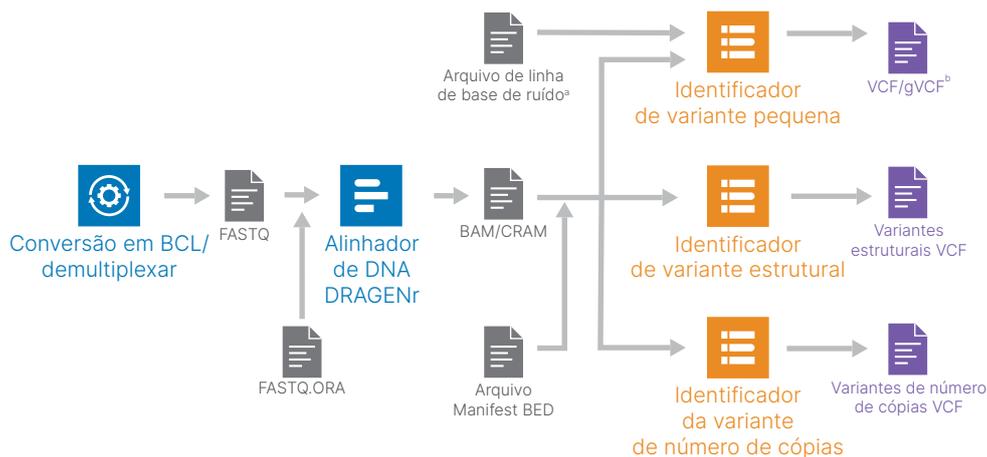


Figura 2: Fluxo de trabalho do DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx App: a análise pode ser configurada no Illumina Run Manager para iniciar automaticamente após a conclusão da corrida de sequenciamento. O fluxo de trabalho inclui geração de arquivos FASTQ, mapeamento/alinhamento e identificação de variantes de linha genética e somática. A compactação com ORA excepcionalmente eficiente pode reduzir o tamanho dos arquivos FASTQ em até 5VEZES.

- a. O DRAGEN Baseline Builder app pode ser usado para criar um arquivo de linha de base de ruído personalizado opcional para uso no modo de variante somática.
b. Os arquivos gVCF não são gerados com a identificação de variante somática.

Tabela 1: Comparação da precisão de identificação de variantes da linha genética no modo IVD

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

Tabela 2: Desempenho da compactação com ORA do DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx application

Tamanho do painel	Tamanho do arquivo FASTQ (GB)	
	Fastq.gza	Fastq.ora
Painel grande (45 Mb)	86,8 GB	25,7 GB

a. O Qzip é uma ferramenta alternativa de compactação para arquivos de saída de dados de sequência com formato *.qz.

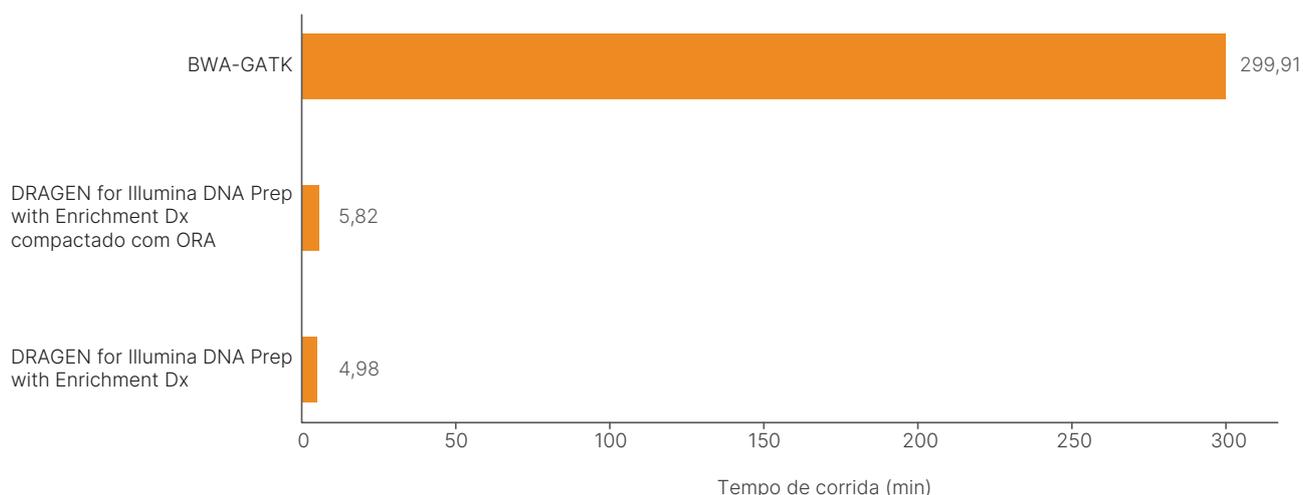


Figura 3: Comparação do tempo de corrida do DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx no Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments vs. análise BWA-GATK em uma plataforma de computação de alto desempenho e 16 núcleos. São mostrados os tempos médios de corrida para análise de linha genética de oito amostras. Os dados de sequenciamento foram gerados através de um painel de exoma de 42,5 Mb com uma profundidade de leitura de 200x.

Resumo

O Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments amplia e simplifica a linha Illumina IVD NGS, integrando a análise secundária por meio do poderoso e intuitivo software DRAGEN. O servidor inclui o Illumina Run Manager combinado com o NextSeq 550Dx Instrument, permitindo que os usuários configurem a corrida de sequenciamento e a análise secundária como parte da configuração de corrida, minimizando erros potenciais do usuário ao reduzir o número de pontos de interação. A análise é iniciada automaticamente

após a corrida de sequenciamento, e o instrumento fica imediatamente disponível para uma nova corrida, reduzindo ao máximo o tempo de inatividade. Em combinação com a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para análise secundária, o Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments oferece aos laboratórios de diagnóstico uma análise secundária simplificada, precisa e em conformidade com o IVDR para identificação de variantes.

Informações para pedido

Produto	N.º do catálogo
DRAGEN Server for NextSeq 550Dx Instruments	20086130
NextSeq 550Dx Instrument	20005715

Saiba mais

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

[NextSeq 550Dx Instrument](#)

[Illumina DNA Prep with Enrichment Dx](#)

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

[Regulamento 2017/746 \(UE\) sobre dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*](#)

Referências

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. Publicado [pendente]. Acessado [pendente].
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/>. Acessado em 12 de dezembro 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. Acessado em 12 de dezembro de 2023.

Declarações de uso pretendido

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Estados Unidos)

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx é um conjunto de reagentes e materiais de consumo usados para preparar bibliotecas de amostras com base em DNA extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e emblocado em parafina. Os painéis de sondas fornecidos pelo usuário são necessários para a preparação de bibliotecas direcionadas a regiões genômicas específicas de interesse. As bibliotecas de amostras geradas destinam-se ao uso em sistemas de sequenciamento da Illumina.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (CE-IVD)

O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit é um conjunto de reagentes e materiais de consumo usados para preparar bibliotecas de amostras com base em DNA genômico derivado de células e tecidos humanos para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico *in vitro*. Os painéis de sondas fornecidos pelo usuário são necessários para a preparação de bibliotecas direcionadas a regiões genômicas específicas de interesse. As bibliotecas de amostras geradas destinam-se ao uso em sistemas de sequenciamento da Illumina. O Illumina DNA Prep with Enrichment Dx inclui software para configuração, monitoramento e análise da corrida de sequenciamento.

NextSeq 550Dx Instrument (Estados Unidos)

O NextSeq 550Dx Instrument destina-se ao sequenciamento direcionado de bibliotecas de DNA baseado em DNA genômico humano extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (FFPE) quando usado em ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD) no instrumento. O NextSeq 550Dx Instrument não se destina ao sequenciamento do genoma completo ou *de novo*. O NextSeq 550Dx Instrument deve ser usado com reagentes de DIV e softwares analíticos registrados e listados, autorizados ou aprovados.

NextSeq 550Dx Instrument (União Europeia/outro)

O NextSeq 550Dx Instrument destina-se ao sequenciamento direcionado de bibliotecas de DNA baseado em DNA genômico humano extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (FFPE) quando usado em ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD) no instrumento.

Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles) (União Europeia)

O Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles) é um conjunto de reagentes e materiais de consumo previsto para o sequenciamento de bibliotecas de amostras quando usado com ensaios validados. O kit destina-se ao uso com o NextSeq 550Dx Instrument e o software analítico.



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 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.
M-GL-01470 PTB v1.0