

# Identificazione di varianti di alta qualità con NovaSeq™ 6000Dx Instrument

Accesso a un flusso di lavoro  
convalidato per l'identificazione  
altamente accurata di varianti  
somatiche e della linea germinale

**illumina**®

## Introduzione

Il NovaSeq 6000Dx Instrument inaugura una nuova era per i laboratori clinici. Lo strumento è in grado di generare fino a 6 Tb di dati in meno di due giorni e fornisce un sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) efficace e scalabile, ad alta processività, in una piattaforma per applicazioni per diagnostica *in vitro* (IVD, *in vitro* diagnostic) regolamentata dalla Food and Drug Administration (FDA) e dotata di marcatura Conformité Européenne (CE) (Figura 1). Il NovaSeq 6000Dx Instrument è compatibile con la più recente soluzione di Illumina per la preparazione delle librerie IVD per il sequenziamento mirato: Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Questo kit offre innovativi trasposoni di tagmentazione su microsferi per mediare una reazione normalizzata. Quando viene utilizzato insieme a una singola e semplificata fase di ibridazione, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx fornisce una rapida soluzione per la preparazione delle librerie e l'arricchimento per l'uso IVD.

Questa nota sull'applicazione mostra una soluzione dal DNA ai dati che combina Illumina DNA Prep with Enrichment Dx con il NovaSeq 6000Dx Instrument e l'analisi secondaria su un DRAGEN™ Server associato con l'app Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Questa soluzione produce dati di sequenziamento di alta qualità e il rilevamento sensibile di varianti somatiche e della linea germinale.

## Metodi

### Preparazione dei campioni

Per la valutazione del rilevamento di varianti della linea germinale, il DNA genomico (gDNA, genomic DNA) è stato estratto da CEPH/UTAH Pedigree 1463 NA12877-NA12880 (Coriell Institute).

Per la valutazione del rilevamento delle varianti somatiche, il DNA è stato estratto da trattamenti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin fixed paraffin embedded) di NA12877 (Coriell Institute, n. di catalogo GM12877) e NA12878 (Coriell Institute, n. di catalogo GM12878) preparati da Horizon Diagnostics.

### Preparazione delle librerie

Le librerie sono state preparate mediante Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a partire da 50 ng di DNA di input per il rilevamento di varianti sia somatiche sia della linea germinale.

### Sequenziamento

Le librerie preparate sono state sequenziate sul NovaSeq 6000Dx Instrument in modalità IVD utilizzando una lunghezza di lettura di 2 × 151 bp. L'analisi dei dati con l'app DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx è stata configurata come parte della pianificazione della corsa di sequenziamento con Illumina Run Manager.

### Analisi dei dati

I dati del sequenziamento sono stati analizzati sul NovaSeq 6000Dx Instrument mediante l'applicazione DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. L'analisi dei dati è stata configurata come parte della corsa di sequenziamento impostata con Illumina Run Manager ed è stata avviata automaticamente dopo il completamento della corsa di sequenziamento, eliminando la necessità di punti di contatto manuali per avviare l'analisi dopo il sequenziamento (Figura 2).

I tempi di esecuzione dell'analisi sono stati calcolati per le celle a flusso IVD S2 e S4 e includevano conversione BCL, mappatura/allineamento e identificazione di varianti all'interno del modulo di analisi DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Tabella 1).



Figura 1: flusso di lavoro di identificazione di varianti. Il NovaSeq 6000Dx Instrument fa parte di un flusso di lavoro integrato costituito da tre fasi che include preparazione delle librerie, sequenziamento a elevata processività, sia in modalità IVD sia in modalità RUO, e analisi dei dati secondaria accelerata grazie a un DRAGEN Server associato.

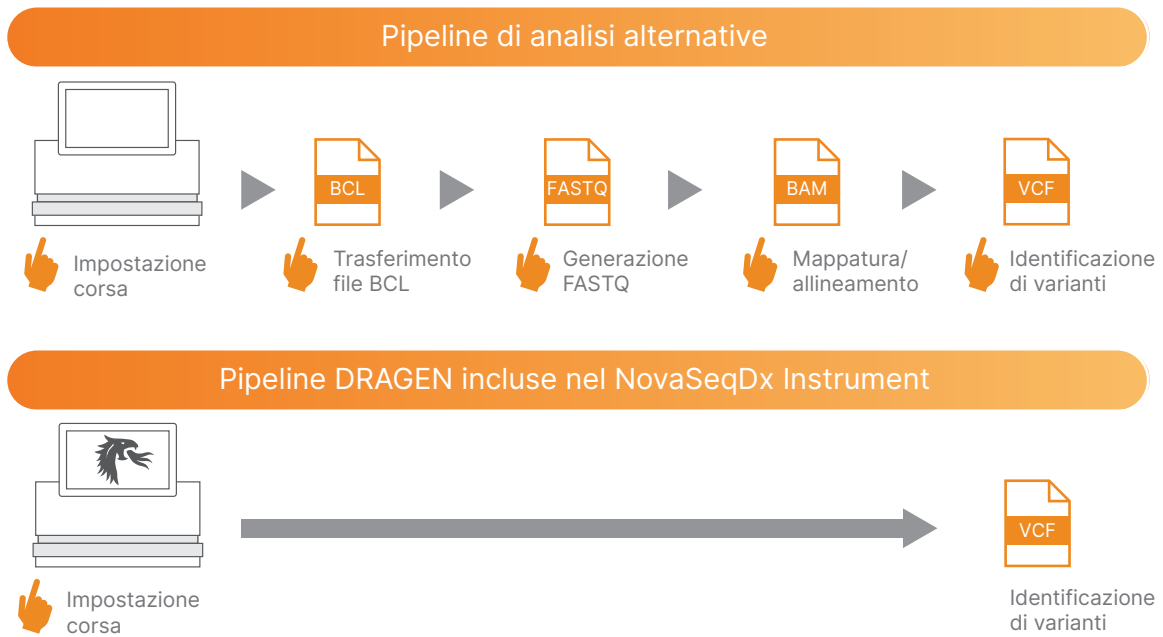


Figura 2: meno punti di contatto con la piattaforma DRAGEN. Le pipeline di analisi alternative richiedono più punti di contatto manuali per eseguire l'analisi dopo il sequenziamento. La piattaforma DRAGEN automatizza molti di questi passaggi, riducendo i punti di contatto manuali alla configurazione iniziale della corsa di sequenziamento e all'analisi terziaria a valle.

I file FASTQ sono stati compressi con DRAGEN ORA Compression, un'opzione che può essere abilitata all'interno del modulo di analisi DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, con conseguente riduzione di circa 5 volte delle dimensioni dei file, trasferimento più rapido dei file e riduzione dei costi di archiviazione dati (Figura 3).

Tabella 1: tempi di analisi sul DRAGEN Server

Parametro	Cella a flusso S2	Cella a flusso S4
Flusso di lavoro	Germline	Somatic
N. di campioni per cella a flusso <sup>a</sup>	47	47
Durata dell'analisi <sup>b</sup>	4,3 ore	9,8 ore

a. Campioni di arricchimento di origine umana con un pannello di arricchimento da 1,9 Mb.  
 b. Media su otto corse di sequenziamento.

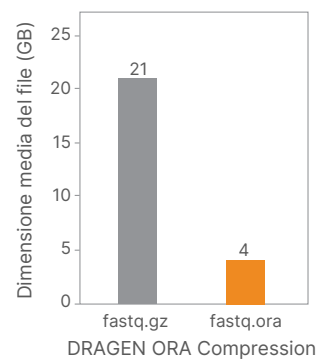


Figura 3: compressione DRAGEN dei file FASTQ. La DRAGEN ORA Compression riduce la dimensione dei file FASTQ di circa 5,2 volte. Media di 98 file FASTQ eseguiti su una cella a flusso S4 nel flusso di lavoro Somatic.

## Risultati

### Identificazione di varianti altamente accurata e precisa

L'accuratezza dell'identificazione di varianti è stata misurata da varie metriche che hanno valutato la precisione dell'identificazione di varianti rispetto a un riferimento noto:

- La **concordanza positiva espressa in percentuale (PPA, positive percent agreement)** è calcolata come la proporzione dei loci classificati come varianti mediante un metodo di riferimento riportati correttamente dal saggio.
- La **concordanza negativa espressa in percentuale (NPA, negative percent agreement)** è calcolata come la proporzione dei loci classificati come wild-type mediante un metodo di riferimento e riportati correttamente dal saggio.
- La **concordanza complessiva espressa in percentuale (OPA, overall percent agreement)** è calcolata come la proporzione dei loci riportati correttamente dal saggio in base a un metodo di riferimento.
- La **percentuale di identificazioni negative** è calcolata come il numero di osservazioni con rapido riferimento come esito in una posizione, diviso per il numero totale di osservazioni testate ed escludendo le osservazioni non valide o quelle filtrate come a bassa profondità.

- La **percentuale di identificazioni positive** è il numero di osservazioni con la variante rilevata, diviso per il numero totale di osservazioni analizzate, escludendo le osservazioni non valide o quelle filtrate come a bassa profondità.

Sono stati ottenuti dati di sequenziamento di alta qualità, che consentono accuratezza e precisione elevate per l'identificazione di varianti somatiche e della linea germinale ([Tabella 2](#), [Tabella 3](#)).

Tabella 3: metriche di precisione per il rilevamento delle varianti

Flusso di lavoro	Metrica	Risultato
Germline	Percentuale identificazioni negative	100%
	Percentuale identificazioni positive	99,7%
Somatic	Percentuale identificazioni negative	100%
	Percentuale identificazioni positive	99,2%

Tabella 2: metriche di accuratezza per il rilevamento delle varianti somatiche e della linea germinale

Criteri	N. di osservazioni <sup>a</sup>	Risultato osservazioni <sup>b</sup>	Risultato per corsa <sup>c</sup>
PPA per varianti di singolo nucleotide (SNV, single nucleotide variant) della linea germinale	846	99,8	99,9
PPA per inserzioni della linea germinale	846	97,9	>99,9
PPA per delezioni della linea germinale	846	96,9	99,9
NPA per il rilevamento delle varianti della linea germinale	846	>99,9	>99,9
OPA per il rilevamento delle varianti della linea germinale	846	>99,9	>99,9
PPA per SNV somatiche	846	99,8	98,9
PPA per inserzioni somatiche	846	100	100
PPA per delezioni somatiche	846	100	100
NPA per rilevamento di varianti somatiche	846	>99,9	>99,9
OPA per rilevamento di varianti somatiche	846	>99,9	>99,9

a. Calcolato come il numero di campioni per corsa (47) × il numero di corse (18) = 846.

b. Valore più basso osservato per replicato di campione su tutte le 18 corse.

c. Valore più basso quando i dati di ciascuna corsa vengono analizzati in aggregato.

## Riepilogo

Questa nota sull'applicazione dimostra l'eccezionale accuratezza ed efficienza di un flusso di lavoro dal DNA ai dati convalidato mediante Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, il NovaSeq 6000Dx Instrument e un DRAGEN Server associato per l'identificazione di varianti somatiche e della linea germinale.

## Maggiori informazioni

NovaSeq 6000Dx instrument, [illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq-6000dx](https://illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq-6000dx)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, [illumina.com/products/by-type/ivd-products/dna-prep-enrichment-dx](https://illumina.com/products/by-type/ivd-products/dna-prep-enrichment-dx)

## Dichiarazioni di uso previsto

### Uso previsto del NovaSeq 6000Dx Instrument (Unione europea (UE)/altro)

Il NovaSeq 6000Dx Instrument è destinato al sequenziamento di librerie di DNA quando utilizzato con saggi per diagnostica *in vitro*. Il NovaSeq 6000Dx Instrument va utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati, certificati o approvati.

### Uso previsto del NovaSeq 6000Dx Instrument (Stati Uniti)

Il NovaSeq 6000Dx Instrument è destinato al sequenziamento mirato di librerie di DNA ottenute da DNA genomico umano estratto da sangue intero periferico o da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), quando utilizzato con i saggi per diagnostica *in vitro* (IVD). Il NovaSeq 6000Dx Instrument non è destinato al sequenziamento dell'intero genoma o al sequenziamento *de novo*. Il NovaSeq 6000Dx Instrument va utilizzato con reagenti IVD e software analitici registrati, certificati o approvati.

### Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (UE/altro)

Il DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo per la preparazione di librerie di campioni a partire da DNA genomico ottenuto da cellule e tessuti umani. 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 (Stati Uniti)

L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit 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®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | [www.illumina.com](https://www.illumina.com)

© 2022 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](https://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00770 ITA v1.0