

Identificação de variantes de alta qualidade com o instrumento NovaSeq™ 6000Dx

Acesse um fluxo de trabalho
validado para a identificação
altamente precisa de variantes
somáticas e de linha genética

illumina®

Introdução

O instrumento NovaSeq 6000Dx inicia uma nova era para o laboratório clínico. Capaz de gerar até 6 Tb de dados em menos de dois dias, ele oferece sequenciamento de última geração (NGS, next-generation sequencing) potente e dimensionável de alto rendimento em uma plataforma regulamentada pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) e com a marca Conformité Européenne (CE) para aplicações de diagnóstico *in vitro* (IVD, *in vitro* diagnostic) (Figura 1). O instrumento NovaSeq 6000Dx é compatível com a mais recente solução de preparação de biblioteca de IVD da Illumina para sequenciamento direcionado, o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Esse kit apresenta transpósons inovadores de marcação no bead para mediar uma reação normalizada. Quando combinado com uma única etapa de hibridização simplificada, o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx oferece uma solução rápida de preparação e enriquecimento de bibliotecas para uso em IVD.

Esta nota de aplicação demonstra uma solução de DNA para dados que combina o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ao instrumento NovaSeq 6000Dx e análise secundária em um servidor DRAGEN™ emparelhado com o aplicativo Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Essa solução produz dados de sequenciamento de alta qualidade e detecção sensível de variantes somáticas e de linha genética.

Métodos

Preparação da amostra

Para a avaliação da detecção de variantes da linha genética, o DNA genômico (gDNA) foi extraído do CEPH/UTAH Pedigree 1463 NA12877-NA12880 (Coriell Institute).

Para a avaliação da detecção de variantes somáticas, o DNA foi extraído de tratamentos FFPE de NA12877 (Coriell Institute, N.º de Catálogo GM12877) e NA12878 (Coriell Institute, N.º de Catálogo GM12878) preparados pela Horizon Diagnostics.

Preparação da biblioteca

As bibliotecas foram preparadas com o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx com base em 50 ng de DNA de entrada para detecção de variantes somáticas e de linha genética.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no instrumento NovaSeq 6000Dx no Modo IVD usando uma duração da leitura de 2 x 151 bp. A análise de dados com o aplicativo DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foi configurada como parte do planejamento da corrida do sequenciamento com o Illumina Run Manager.

Análise de dados

Os dados de sequenciamento foram analisados usando o aplicativo DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx no instrumento NovaSeq 6000Dx. A análise de dados foi configurada como parte da configuração da corrida do sequenciamento com o Illumina Run Manager e foi iniciada automaticamente após a conclusão da corrida do sequenciamento, eliminando a necessidade de pontos de contato manuais para iniciar a análise após o sequenciamento (Figura 2).

Os tempos de corrida da análise foram calculados para as lâminas de fluxo S2 e S4 IVD e incluíram Conversão BCL, mapeamento/alinhamento e identificação de variantes, tudo dentro do módulo de análise DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Tabela 1).



Figura 1: fluxo de trabalho de identificação de variantes: o instrumento NovaSeq 6000Dx faz parte de um fluxo de trabalho integrado de três etapas que inclui a preparação da biblioteca, o sequenciamento de alto rendimento no modo IVD ou RUO e a análise acelerada de dados secundários com um servidor DRAGEN emparelhado.

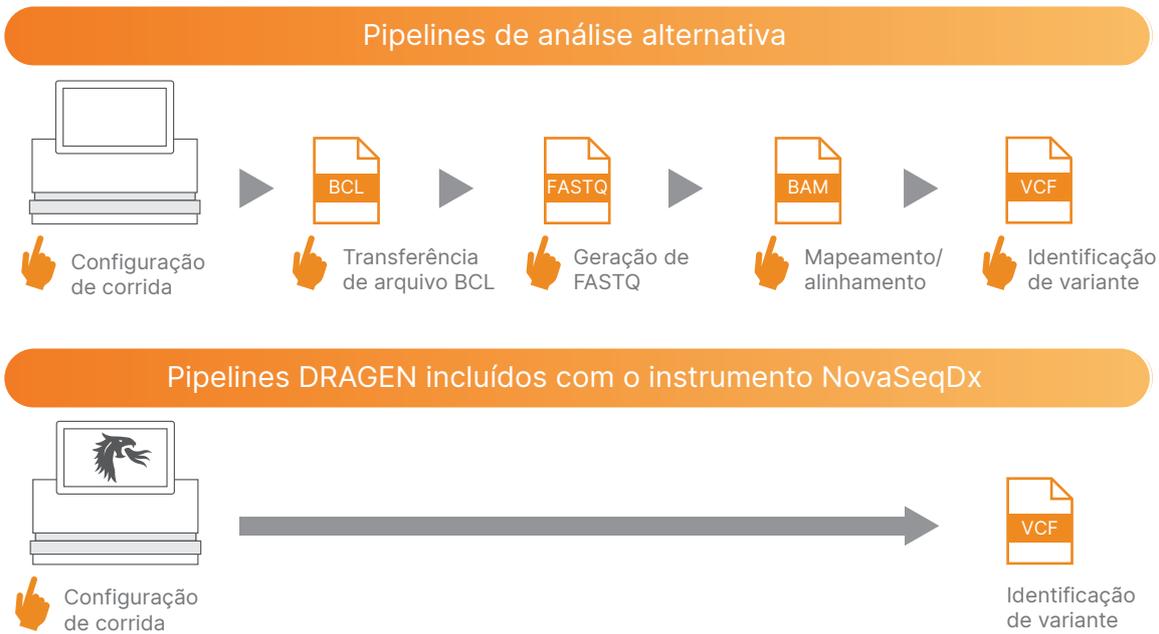


Figura 2: menos pontos de contato com a plataforma DRAGEN: os pipelines de análise alternativos exigem vários pontos de contato manuais para executar a análise após o sequenciamento. A plataforma DRAGEN automatiza muitas dessas etapas, reduzindo os pontos de contato manuais para a configuração inicial da corrida do sequenciamento e a análise terciária posterior.

Os arquivos FASTQ foram compactados com a DRAGEN ORA Compression, uma opção que pode ser ativada no módulo de análise DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, resultando em tamanhos de arquivo ~5x vezes menores, transferências de arquivos mais rápidas e custos reduzidos de armazenamento de dados (Figura 3).

Tabela 1: tempos de análise no Servidor DRAGEN

Parâmetro	Lâmina de fluxo S2	Lâmina de fluxo S4
Fluxo de trabalho	Linha genética	Somática
Número de amostras por lâmina de fluxo ^a	47	47
Tempo de análise ^b	4,3 horas	9,8 horas

a. Amostras de enriquecimento humano com um painel de enriquecimento de 1,9 Mb.
 b. Média em 8 corridas do sequenciamento.

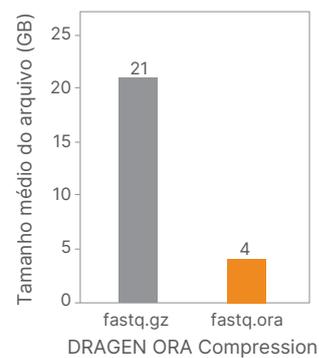


Figura 3: compactação do DRAGEN de arquivos FASTQ: a DRAGEN ORA Compression reduz o tamanho do arquivo FASTQ em ~5,2 vezes. Média de 98 arquivos FASTQ executados em uma lâmina de fluxo S4 em fluxo de trabalho somático.

Resultados

Identificação de variantes altamente precisa e exata

A precisão da identificação de variantes foi medida por várias métricas que avaliaram a precisão da identificação de variantes em relação a uma referência conhecida:

- **Concordância percentual positiva (PPA, positive percent agreement):** calculada como a proporção de locais classificados como variantes por um método de referência que o ensaio informa corretamente.
- **Concordância percentual negativa (NPA, negative percent agreement):** calculada como a proporção de locais classificados como tipo selvagem por um método de referência que o ensaio informa corretamente.
- **Concordância percentual geral (OPA, overall percent agreement):** calculada como a proporção de locais corretamente relatados pelo ensaio em relação a um método de referência.
- **Porcentagem de identificações negativas:** calculada como o número de observações que passam pela referência como o resultado em uma posição dividido pelo número total de observações testadas, excluindo quaisquer observações inválidas ou aquelas filtradas como de baixa profundidade.

- **Porcentagem de identificações positivas:** calculada como o número de observações com a variante detectada dividido pelo número total de observações testadas, excluindo quaisquer observações inválidas ou aquelas filtradas como de baixa profundidade.

Foram obtidos dados de sequenciamento de alta qualidade, permitindo alta exatidão e precisão para a identificação de variantes somáticas e de linha genética ([Tabela 2](#), [Tabela 3](#)).

Tabela 3: métricas de precisão para detecção de variantes

Fluxo de trabalho	Métrica	Resultado
Linha genética	Porcentagem de identificações negativas	100%
	Porcentagem de identificações positivas	99,7%
Somática	Porcentagem de identificações negativas	100%
	Porcentagem de identificações positivas	99,2%

Tabela 2: métricas de precisão para detecção de variantes somáticas e de linha genética

Crítérios	N.º de observações ^a	Resultado das observações ^b	Resultado por corrida ^c
PPA para SNVs de linha genética	846	99,8	99,9
PPA para inserções de linha genética	846	97,9	>99,9
PPA para deleções de linha genética	846	96,9	99,9
NPA para detecção de variantes de linha genética	846	>99,9	>99,9
OPA para detecção de variantes de linha genética	846	>99,9	>99,9
PPA para SNVs somáticas	846	99,8	98,9
PPA para inserções somáticas	846	100	100
PPA para deleções somáticas	846	100	100
NPA para detecção de variantes somáticas	846	>99,9	>99,9
OPA para detecção de variantes somáticas	846	>99,9	>99,9

a. Calculado como o número de amostras por corrida (47) × número de corridas (18) = 846.

b. Menor valor observado por réplica de amostra em todas as 18 corridas.

c. Valor mais baixo quando os dados de cada corrida são analisados de forma agregada.

Resumo

Esta nota de aplicação demonstra a precisão e a eficiência excepcionais de um fluxo de trabalho validado de DNA para dados usando o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, o instrumento NovaSeq 6000Dx e um servidor DRAGEN emparelhado para identificação de variantes somáticas e de linha genética.

Saiba mais

Instrumento NovaSeq 6000Dx, illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq-6000dx

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, illumina.com/products/by-type/ivd-products/dna-prep-enrichment-dx

illumina®

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

© 2022 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-00770 PTB v1.0

Declarações de uso pretendido

Uso pretendido do instrumento NovaSeq 6000Dx (União Europeia/outros)

O instrumento NovaSeq 6000Dx destina-se ao sequenciamento de bibliotecas de DNA quando usado com ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD). O instrumento NovaSeq 6000Dx destina-se ao uso com reagentes IVD específicos registrados, certificados ou aprovados e software analítico.

Uso pretendido do instrumento NovaSeq 6000Dx (Estados Unidos)

O instrumento NovaSeq 6000Dx 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 embebido em parafina (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded) quando usado com ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD). O instrumento NovaSeq 6000Dx não se destina ao sequenciamento do genoma completo ou *inicial*. O instrumento NovaSeq 6000Dx destina-se ao uso com reagentes IVD específicos registrados, certificados ou aprovados e software analítico.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (UE/outros)

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 genômico derivado de células e tecidos humanos. 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 (Estados Unidos)

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 extraído de sangue total periférico ou de tecido fixado em formalina e embebido 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.