

Hochwertiges Varianten- Calling mit dem NovaSeq™ 6000Dx-Gerät

Validierter Workflow für
das hochpräzise Calling
von Keimbahn- und
somatischen Varianten

illumina®

Einleitung

Das NovaSeq 6000Dx-Gerät läutet eine neue Ära klinischer Laboranwendungen ein. Das Gerät kann in weniger als zwei Tagen bis zu 6 Tb Daten generieren und stellt damit eine leistungsstarke und skalierbare FDA-konforme (Food and Drug Administration) Hochdurchsatz-Plattform mit CE-Kennzeichnung (Conformité Européenne) für die Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) bei IVD-Anwendungen (*In-vitro*-Diagnostik) dar ([Abbildung 1](#)). Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist kompatibel mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, der aktuellen Lösung von Illumina zur Vorbereitung von IVD-Bibliotheken für die gezielte Sequenzierung. Dieses Kit umfasst die innovative On-Bead-Tagmentierung per Transposons, die eine einheitliche Tagmentierungsreaktion gewährleistet. In Kombination mit einem vereinfachten, einzigen Hybridisierungsschritt steht mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx eine Lösung für die schnelle Vorbereitung und Anreicherung von Bibliotheken bei der IVD zur Verfügung.

Im vorliegenden Anwendungshinweis wird eine DNA-zu-Daten-Lösung präsentiert, die Illumina DNA Prep with Enrichment Dx mit dem NovaSeq 6000Dx-Gerät und der Sekundäranalyse auf einem gekoppelten DRAGEN™ Server mit der Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-App kombiniert. Diese Lösung liefert hochwertige Sequenzierungsdaten und zeichnet sich durch einen sensitiven Nachweis von Keimbahn- und somatischen Varianten aus.

Methoden

Probenvorbereitung

Zur Evaluierung des Nachweises von Keimbahnvarianten wurde genomische DNA (gDNA) aus CEPH/UTAH Pedigree 1463 NA12877-NA12880 (Coriell Institute) extrahiert.

Zur Evaluierung des Nachweises somatischer Varianten wurde DNA aus FFPE-Proben extrahiert, die von Horizon Diagnostics aus NA12877 (Coriell Institute, Katalog-Nr. GM12877) und NA12878 (Coriell Institute, Katalog-Nr. GM12878) vorbereitet wurden.

Bibliotheks Vorbereitung

Die Bibliotheken wurden mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx anhand einer Zugabe von 50 ng DNA für den Nachweis von Keimbahn- und somatischen Varianten vorbereitet.

Sequenzierung

Die vorbereiteten Bibliotheken wurden auf dem NovaSeq 6000Dx-Gerät im IVD-Modus mit einer Read-Länge von 2×151 bp sequenziert. Die Datenanalyse mit der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-App wurde während der Planung des Sequenzierungslaufs mit Illumina Run Manager konfiguriert.

Datenanalyse

Die Sequenzierungsdaten wurden auf dem NovaSeq 6000Dx-Gerät mit der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-App analysiert. Die Datenanalyse wurde als Teil des mit Illumina Run Manager eingerichteten Sequenzierungslaufs konfiguriert. Sie wurde nach Abschluss des Sequenzierungslaufs automatisch gestartet, sodass hierzu kein manueller Eingriff erforderlich war ([Abbildung 2](#)).

Analyselaufrzeiten wurden sowohl für S2- als auch für S4-IVD-Fließzellen berechnet und umfassten BCL-Konvertierung, Mapping/Alignment und Varianten-Calling – alles innerhalb des DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Analysenmoduls ([Tabelle 1](#)).



Abbildung 1: Workflow für das Varianten-Calling: Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist Bestandteil eines integrierten Workflows mit drei Schritten, der die Bibliotheksvorbereitung, die Hochdurchsatzsequenzierung im IVD- oder RUO-Modus und die beschleunigte Sekundäranalyse der Daten mit einem gekoppelten DRAGEN Server umfasst.

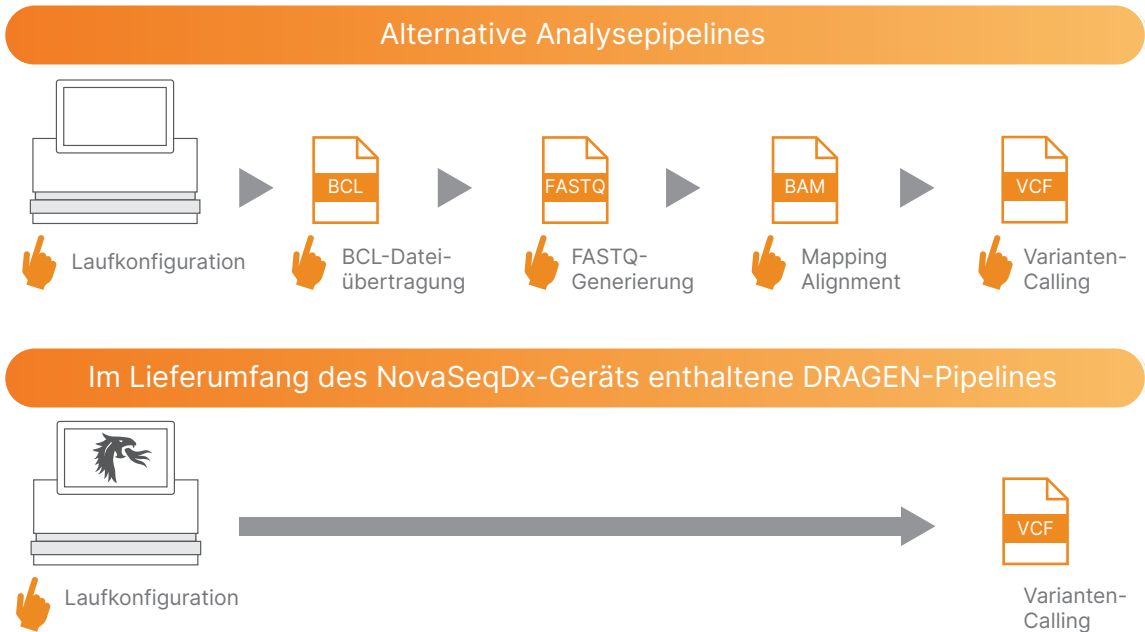


Abbildung 2: Geringerer manueller Aufwand mit der DRAGEN-Plattform: Alternative Analysepipelines erfordern zur Durchführung der Analyse im Anschluss an die Sequenzierung mehrere manuelle Eingriffe. Die DRAGEN-Plattform automatisiert viele dieser Schritte und reduziert den manuellen Aufwand auf die Einrichtung des ersten Sequenzierungslaufs und die nachgeschaltete Tertiäranalyse.

Die FASTQ-Dateien wurden mit DRAGEN Ora Compression komprimiert. Diese Option kann innerhalb des DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Analysemoduls aktiviert werden. Sie reduziert die Dateigröße ungefähr um den Faktor 5, beschleunigt die Dateiübertragung und senkt die Kosten für die Datenspeicherung (Abbildung 3).

Tabelle 1: Analysedauer auf dem DRAGEN Server

Parameter	S2-Fließzelle	S4-Fließzelle
Workflow	Keimbahn	Somatisch
Anzahl der Proben pro Fließzelle ^a	47	47
Analysedauer ^b	4,3 Stunden	9,8 Stunden

a. Human-Anreicherungsproben mit einem Anreicherungspanel mit 1,9 Mb.
 b. Durchschnitt über acht Sequenzierungsläufe.

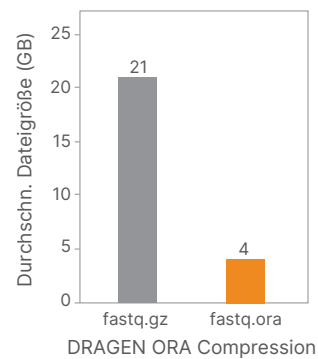


Abbildung 3: DRAGEN-Komprimierung von FASTQ-Dateien: Die DRAGEN Ora Compression reduziert die Größe der FASTQ-Dateien ungefähr um den Faktor 5,2. Durchschnitt bei 98 FASTQ-Dateien, die auf einer S4-Fließzelle im Workflow zum Nachweis somatischer Varianten durchgeführt wurden.

Ergebnisse

Hochgenaues, präzises Varianten-Calling

Die Genauigkeit des Varianten-Callings wurde anhand verschiedener Metriken bestimmt, durch die die Genauigkeit des Varianten-Callings mit Werten einer bekannten Referenz verglichen wurde:

- **Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA, Positive Percent Agreement):** wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Varianten klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
- **Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA, Negative Percent Agreement):** wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Wildtyp klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
- **Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA, Overall Percent Agreement):** wird als der Anteil der Loci berechnet, die vom Assay in Bezug auf eine Referenzmethode korrekt gemeldet werden.
- **Prozentsatz negativer Calls (PNC):** wird als Anzahl der Beobachtungen mit bestandener Referenz als Ergebnis an einer Position geteilt durch die Gesamtzahl der getesteten Beobachtungen berechnet, ausgenommen ungültiger Beobachtungen oder solcher, die als geringe Tiefe gefiltert wurden.

- **Prozentsatz positiver Calls (PPC):** wird als Anzahl der Beobachtungen berechnet, bei denen die Variante nachgewiesen wurde, dividiert durch die Gesamtzahl der getesteten Beobachtungen, ausgenommen ungültiger Beobachtungen oder solcher, die als geringe Tiefe gefiltert wurden.

Es wurden qualitativ hochwertige Sequenzierungsdaten generiert, die eine hohe Genauigkeit und Präzision beim Calling von Keimbahn- und somatischen Varianten ermöglichen ([Tabelle 2](#), [Tabelle 3](#)).

Tabelle 3: Präzisionsmetriken für das Varianten-Calling

Workflow	Metrik	Ergebnis
Keimbahn	Prozentsatz negativer Calls	100 %
	Prozentsatz positiver Calls	99,7 %
Somatisch	Prozentsatz negativer Calls	100 %
	Prozentsatz positiver Calls	99,2 %

Tabelle 2: Genauigkeitsmetriken für das Calling von Keimbahn- und somatischen Varianten

Kriterien	Anzahl der Beobachtungen ^a	Ergebnis der Beobachtungen ^b	Ergebnis nach Lauf ^c
PPA für Keimbahn-SNVs	846	99,8	99,9
PPA für Keimbahn-Insertionen	846	97,9	> 99,9
PPA für Keimbahn-Deletionen	846	96,9	99,9
NPA für den Nachweis von Keimbahnvarianten	846	> 99,9	> 99,9
OPA für den Nachweis von Keimbahnvarianten	846	> 99,9	> 99,9
PPA für somatische SNVs	846	99,8	98,9
PPA für somatische Insertionen	846	100	100
PPA für somatische Deletionen	846	100	100
NPA für den Nachweis somatischer Varianten	846	> 99,9	> 99,9
OPA für den Nachweis somatischer Varianten	846	> 99,9	> 99,9

a. Berechnet als die Anzahl der Proben pro Lauf (47) × Anzahl an Läufen (18) = 846.

b. Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikat über alle 18 Läufe hinweg.

c. Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

Zusammenfassung

Der vorliegende Anwendungshinweis demonstriert die außergewöhnliche Genauigkeit und Effizienz eines validierten DNA-zu-Daten-Workflows mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, dem NovaSeq 6000Dx-Gerät und einem gekoppelten DRAGEN Server zum Calling von Keimbahn- und somatischen Varianten.

Weitere Informationen

NovaSeq 6000Dx-Gerät: illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq-6000dx

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

Erklärungen zur bestimmungsgemäßen Verwendung

Bestimmungsgemäße Verwendung des NovaSeq 6000Dx-Geräts (Europäische Union/andere Länder)

Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD) vorgesehen. Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist für spezielle registrierte, zertifizierte oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware vorgesehen.

Bestimmungsgemäße Verwendung des NovaSeq 6000Dx-Geräts (USA)

Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD) für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, die aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) gewonnen wurden. Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist nicht für die Genom- oder *De-novo*-Sequenzierung vorgesehen. Das NovaSeq 6000Dx-Gerät ist für spezielle registrierte, zertifizierte oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware vorgesehen.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (EU/andere Länder)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus genomischer DNA aus menschlichen Zellen und menschlichem Gewebe. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Benutzer bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenziersystemen von Illumina vorgesehen.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (USA)

Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit besteht aus einem Satz Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus DNA verwendet werden, die aus peripherem Vollblut und formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe gewonnen wurde. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Benutzer bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenziersystemen von Illumina vorgesehen.

illumina®

1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566
(Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00770 DEU v1.0