

Llamada de variantes de alta calidad con el instrumento NovaSeqTM 6000Dx

Acceda a un flujo de trabajo
validado para una llamada de
variantes somáticas y germinales
de alta precisión

illumina[®]

Introducción

El instrumento NovaSeq 6000Dx marca el comienzo de una nueva era en el laboratorio clínico. Puede generar hasta 6 TB de datos en menos de dos días y ofrece una secuenciación de nueva generación (NGS, next generation sequencing) de alta productividad, potente y flexible, en una plataforma regulada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) y con marcado de Conformidad Europea (CE, Conformité Européenne) para aplicaciones de diagnóstico *in vitro* (DIV) (figura 1). El instrumento NovaSeq 6000Dx es compatible con la última solución de preparación de librerías de DIV de Illumina para la secuenciación selectiva, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Este kit cuenta con la innovadora tecnología de tagmentación en bolas, que usa transposomas para mediar en una reacción normalizada. Cuando se combina con un paso de hibridación única simplificado, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx proporciona una solución rápida de enriquecimiento y preparación de librerías para uso en DIV.

Esta nota de aplicación muestra una solución de ADN a datos que combina Illumina DNA Prep with Enrichment Dx con el instrumento NovaSeq 6000Dx y un análisis secundario en un servidor DRAGEN™ emparejado con la aplicación Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Esta solución produce datos de secuenciación de alta calidad y detección sensible de variantes germinales y somáticas.

Métodos

Preparación de muestras

Para la evaluación de la detección de variantes germinales, se extrajo ADN genómico (ADNg) de CEPH/UTAH Pedigree 1463 NA12877-NA12880 (Coriell Institute).

Para la evaluación de la detección de variantes somáticas, se extrajo ADN de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, formalin fixed and paraffin embedded) de NA12877 (Coriell Institute, n.º de catálogo GM12877) y NA12878 (Coriell Institute, n.º de catálogo GM12878) preparado por Horizon Diagnostics.

Preparación de librerías

Las librerías se prepararon con Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a partir de 50 ng de ADN para la detección de variantes germinales y somáticas.

Secuenciación

Las librerías preparadas se secuenciaron en el instrumento NovaSeq 6000Dx en modo DIV con una longitud de lectura de 2 × 151 pb. El análisis de datos con la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se configuró como parte de la planificación del experimento de secuenciación con Illumina Run Manager.

Análisis de datos

Los datos de secuenciación se analizaron utilizando la aplicación DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en el instrumento NovaSeq 6000Dx. El análisis de datos se configuró como parte de la configuración del experimento de secuenciación con Illumina Run Manager y se lanzó automáticamente después de que se completara el experimento de secuenciación, eliminando la necesidad de puntos de contacto manuales para iniciar el análisis después de la secuenciación (figura 2).

Se calcularon los tiempos de ejecución del análisis para las celdas de flujo de DIV S2 y S4 e incluyeron la conversión de BCL, la asignación/alineación y la llamada de variantes, todo dentro del módulo de análisis DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (tabla 1).



Figura 1: Flujo de trabajo de llamada de variantes. El instrumento NovaSeq 6000Dx forma parte de un flujo de trabajo integrado de tres pasos que incluye la preparación de librerías, la secuenciación de alta productividad en modo de DIV o de investigación (RUO) y los análisis de datos secundarios acelerados con un servidor DRAGEN emparejado.

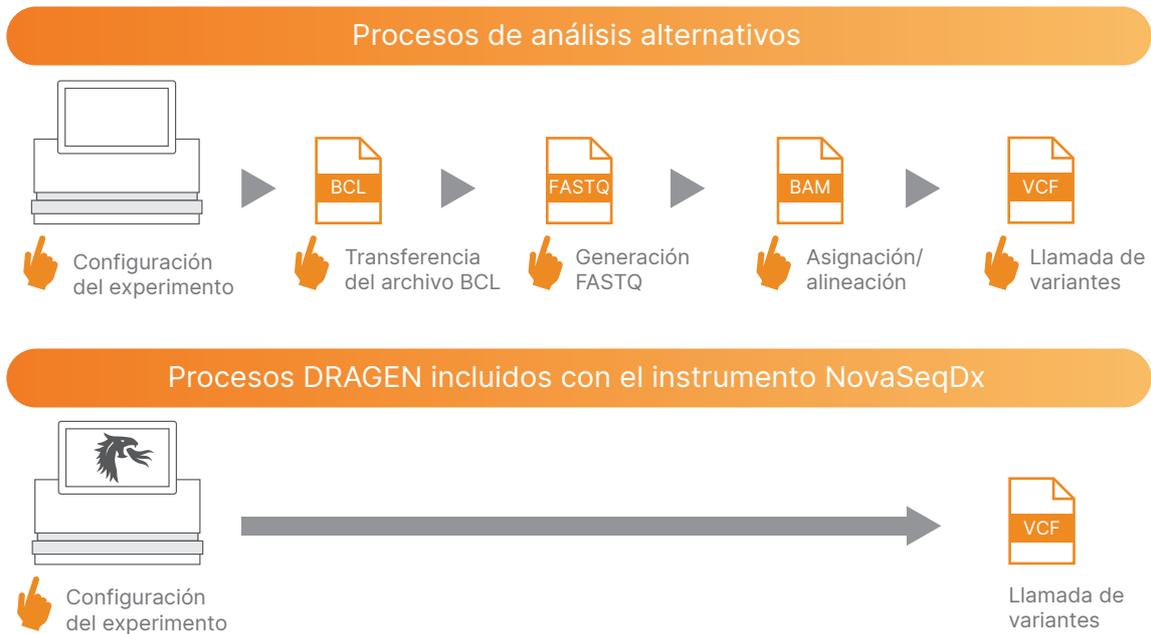


Figura 2: Menos puntos de contacto con la plataforma DRAGEN. Los procesos de análisis alternativos requieren varios puntos de contacto manuales para ejecutar el análisis después de la secuenciación. La plataforma DRAGEN automatiza muchos de estos pasos, reduciendo los puntos de contacto manuales en la configuración inicial del experimento de secuenciación y el análisis terciario posterior.

Los archivos FASTQ se comprimieron con DRAGEN Ora Compression, una opción que se puede habilitar dentro del módulo de análisis DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, lo que da como resultado unos tamaños de archivo aproximadamente 5 veces más pequeños, transferencias de archivos más rápidas y menores costes de almacenamiento de datos (figura 3).

Tabla 1: Tiempos de análisis en el servidor DRAGEN

Parámetro	Celda de flujo S2	Celda de flujo S4
Flujo de trabajo	Germinal	Somático
N.º de muestras por celda de flujo ^a	47	47
Duración del análisis ^b	4,3 horas	9,8 horas

a. Muestras de enriquecimiento de origen humano con un panel de enriquecimiento de 1,9 Mb.
 b. Promedio en 8 experimentos de secuenciación.

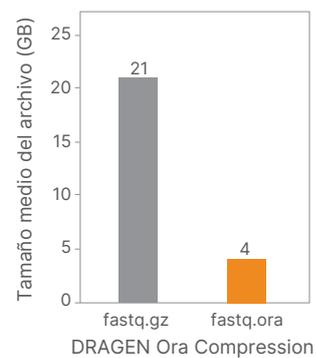


Figura 3: Compresión DRAGEN de archivos FASTQ. DRAGEN Ora Compression reduce el tamaño del archivo FASTQ unas 5,2 veces. Promedio de 98 archivos FASTQ ejecutados en una celda de flujo S4 en un flujo de trabajo somático.

Resultados

Llamada de variantes muy precisa y exacta

La precisión de la llamada de variantes se midió mediante diversos criterios de medición que evaluaron la precisión de la llamada de variantes frente a una referencia conocida:

- La coincidencia de porcentaje positivo (PPA, **positive percent agreement**) es la proporción de locus que se clasifican como variantes usando un método de referencia y que se detectan de forma correcta en el ensayo.
- La coincidencia de porcentaje negativo (NPA, **negative percent agreement**) es la proporción de locus que se clasifican como en estado natural por medio de un método de referencia y que se detectan de forma correcta en el ensayo.
- La coincidencia total de porcentajes (OPA, **overall percent agreement**) se calcula como la proporción de locus que se detectan correctamente en el ensayo con respecto al método de referencia.
- El porcentaje de llamadas negativas se calcula como el número de observaciones con una referencia que supera el filtro como resultado en una posición, dividido por el número total de observaciones analizadas, excluyendo las observaciones no válidas o las filtradas como de baja profundidad.

- El porcentaje de llamadas positivas es el número de observaciones con la variante detectada dividido por el número total de observaciones analizadas, excluyendo las observaciones no válidas o las filtradas como de baja profundidad.

Se obtuvieron datos de secuenciación de alta calidad, lo que permite una alta exactitud y precisión para la llamada de variantes germinales y somáticas (tabla 2, tabla 3).

Tabla 3: Criterios de medición de la precisión para la detección de variantes

Flujo de trabajo	Criterio de medición	Resultado
Germinal	Porcentaje de llamadas negativas	100 %
	Porcentaje de llamadas positivas	99,7 %
Somático	Porcentaje de llamadas negativas	100 %
	Porcentaje de llamadas positivas	99,2 %

Tabla 2: Criterios de medición de la precisión para la detección de variantes germinales y somáticas

Criterios	N.º de observaciones ^a	Resultado de las observaciones ^b	Resultado por experimento ^c
PPA para SNV germinales	846	99,8	99,9
PPA para inserciones germinales	846	97,9	>99,9
PPA para deleciones germinales	846	96,9	99,9
NPA para la detección de variantes germinales	846	>99,9	>99,9
OPA para la detección de variantes germinales	846	>99,9	>99,9
PPA para SNV somáticas	846	99,8	98,9
PPA para inserciones somáticas	846	100	100
PPA para deleciones somáticas	846	100	100
NPA para detección de variantes somáticas	846	>99,9	>99,9
OPA para detección de variantes somáticas	846	>99,9	>99,9

a. Calculado de la siguiente manera: número de muestras por experimento (47) × número de experimentos (18) = 846.

b. Valor observado más bajo por duplicado de muestra en los 18 experimentos en total.

c. Valor más bajo cuando los datos de cada experimento se analizan en conjunto.

Resumen

Esta nota de aplicación demuestra la excepcional precisión y eficiencia de un flujo de trabajo validado de ADN a datos con Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, el instrumento NovaSeq 6000Dx y un servidor DRAGEN emparejado para la llamada de variantes germinales y somáticas.

Más información

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



1.800.809.4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00770 ESP v1.0

Declaraciones de uso previsto

Uso previsto del instrumento NovaSeq 6000Dx (Unión Europea/otros)

El instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para la secuenciación de librerías de ADN, cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV). El instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para usarse con un software de análisis y reactivos de DIV específicos registrados, certificados o aprobados.

Uso previsto del instrumento NovaSeq 6000Dx (Estados Unidos)

El instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para la secuenciación selectiva de librerías de ADN a partir de ADN genómico humano extraído de sangre completa periférica o de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro* (DIV). El instrumento NovaSeq 6000Dx no está indicado para la secuenciación del genoma completo o *de novo*. El instrumento NovaSeq 6000Dx está concebido para usarse con un software de análisis y reactivos de DIV específicos registrados, certificados o aprobados.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (UE/otros)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx es un juego de reactivos y consumibles usados para preparar librerías de muestras a partir de ADN genómico derivado de células y tejidos humanos. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sondas proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx (Estados Unidos)

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es un juego de reactivos y consumibles usados para preparar librerías de muestras a partir de ADN extraído de sangre completa periférica y de tejido fijado en formol y embebido en parafina. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sondas proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina.