

TruSight™ Oncology 500 ctDNA

Strumento per la mappatura genomica esaustiva interna su campioni biotici liquidi.

Punti principali

- Rende possibile la mappatura genomica esaustiva dal sangue**
 Consente la valutazione interna delle varianti di DNA in 523 geni, compresi i biomarcatori bTMB e bMSI*
- Consente la biopsia liquida eseguita internamente**
 Permette l'utilizzo di campioni di plasma non invasivi come alternativa, o integrazione, a campioni di tessuto limitati
- Genera risultati affidabili**
 Assicura bassi limiti di rilevamento grazie alla preparazione della libreria di cattura basata su UMI, al sequenziamento ad alta intensità con sistema NovaSeq™ 6000 e alla bioinformatica avanzata
- Sfrutta l'integrazione del flusso di lavoro**
 Passa dal cfDNA all'interpretazione dei report sulla piattaforma DRAGEN™ Bio-IT per l'identificazione delle varianti in cinque giorni

* bTMB e bMSI sono marcatori basati sul plasma del sangue

Introduzione

La biopsia liquida consente un'analisi esaustiva del DNA libero circolante (cfDNA) nel plasma, fornendo un approccio non invasivo per la profilazione dei tumori solidi. Per sfruttare i vantaggi della biopsia liquida, è fondamentale utilizzare un saggio altamente sensibile e specifico in grado di rilevare mutazioni somatiche a basse frequenze. TruSight Oncology 500 ctDNA sfrutta la potenza della collaudata tecnologia di sequenziamento di nuova generazione Illumina (NGS) per ottenere l'elevata sensibilità necessaria e rende possibile un profilo genomico completo del DNA tumorale circolante (ctDNA) presente nel cfDNA (Figura 1, Tabella 1). La combinazione tra questa soluzione avanzata e la potenza bioinformatica del software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA offre ai ricercatori clinici una soluzione completa dal DNA al report per la valutazione di più tipi di varianti su centinaia di geni in un unico saggio.

TruSight Oncology 500 ctDNA è compatibile con i reagenti di sequenziamento NovaSeq 6000 v1.5. Oltre all'aumento dell'efficienza operativa che si traduce in una potenziale riduzione del prezzo per campione che può superare il 35%, questi reagenti sono caratterizzati da una durata di conservazione prolungata di sei mesi e dal miglioramento dei punteggi Q30.

Tabella 1. TruSight Oncology 500 ctDNA in sintesi

Parametro	Dettagli
Strumento	Sistema NovaSeq 6000
Dimensione del pannello	1,94 Mb DNA
Contenuto del pannello	523 geni 59 geni per CNV 23 geni per fusioni geniche MSI (> 2400 loci) TMB
Requisito di input di DNA	30 ng cfDNA ^a
Tipo di campione	cfDNA derivato da sangue
Durata totale del saggio	5 giorni dalla preparazione della libreria al report sulla variante
Durata della corsa di sequenziamento	Corsa: 36 ore; analisi: 10 ore (cella a flusso S2) Corsa: 45 ore; analisi: 22 ore (cella a flusso S4)
Corsa di sequenziamento	2 × 151 bp
Processività campioni	8 campioni per corsa (cella a flusso S2) 24 campioni per corsa (cella a flusso S4) 48 campioni per kit di preparazione libreria
Limite di rilevamento	0,5% di VAF per varianti piccole Variazione ≥ 1,4 volte per amplificazioni del gene Variazione ≤ 0,6 volte per delezioni del gene ≥ 2% della frazione di tumore per MSI
Sensibilità analitica	≥ 95% (al LOD per tutti i tipi di variante)
Specificità analitica	≥ 95%

a. Quantificazione raccomandata con sistemi Agilent TapeStation o Fragment Analyzer

Il potere della biopsia liquida

A differenza di una biopsia tissutale, che fornisce informazioni provenienti solo da una frazione del tumore, la biopsia liquida fornisce informazioni sull'eterogeneità intra-tumorale e inter-tumorale in tutto il corpo. Studi recenti dimostrano che l'analisi del cfDNA ha rilevato un numero significativo di biomarcatori raccomandati dalle linee guida e di alterazioni della resistenza non individuati nelle biopsie dei tessuti corrispondenti.¹ Inoltre, uno studio sul tumore polmonare non a piccole cellule ha rivelato che le analisi del cfDNA presentano un elevato livello di concordanza con le analisi basate sui tessuti.²



Figura 1. La biopsia liquida consente la creazione di profili di biomarcatori per più tipi di varianti e più tipi di tumore. I sofisticati algoritmi di identificazione delle varianti e l'elevata profondità di sequenziamento consentono il rilevamento di biomarcatori chiave in cfDNA con limite di rilevazione (LOD) dello 0,5%.

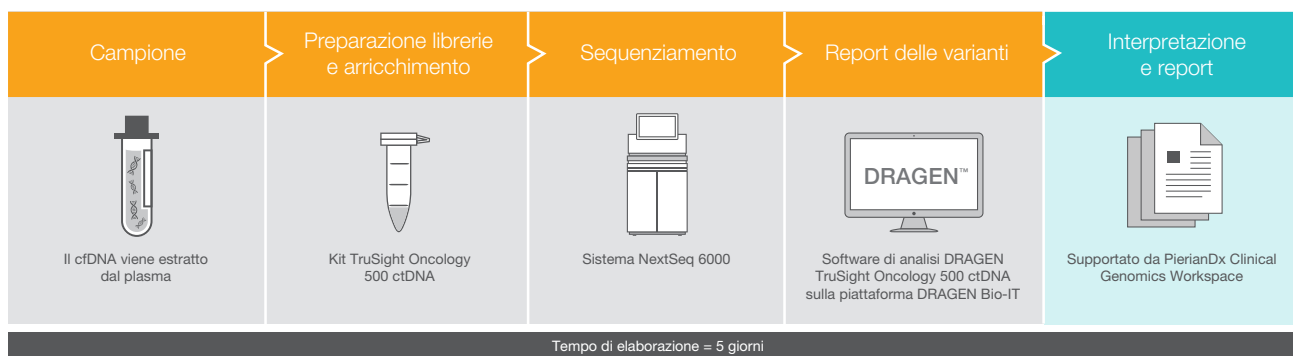


Figura 2. Flusso di lavoro del saggio TruSight Oncology 500 ctDNA. Il saggio TruSight Oncology 500 ctDNA si integra nei flussi di lavoro di laboratorio correnti, permettendo di passare dal cfDNA a un rapporto sulle varianti in cinque giorni.

Una base completa di contenuti

I contenuti del saggio TruSight Oncology 500 ctDNA sono stati progettati con il contributo di autorità riconosciute nella comunità oncologica e includono biomarcatori attuali ed emergenti con una copertura estesa dei geni coinvolti nelle linee guida chiave e negli studi clinici per diversi tipi di tumore. La sonda del pannello è stata ideata per catturare sia le fusioni geniche note che quelle nuove e comprende 523 geni, così da rilevare le varianti che potrebbero avere un ruolo nella tumorigenesi. I biomarcatori comprendono varianti mononucleotidiche (SNV), inserzioni/delezioni (indel), varianti del numero di copie (CNV), fusioni geniche e firme genomiche complesse di immuno-oncologia, come l'instabilità microsatellitare (MSI) e il carico mutazionale del tumore (TMB) (Tabella 2). Per un elenco completo dei geni, visitare la pagina www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html.

Tabella 2. Esempi di varianti rilevate con TruSight Oncology 500 ctDNA

Tipo di variante	Esempi rilevanti
SNV e indel	<i>EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF</i>
Fusioni geniche	<i>ALK, ROS1, NTRK, RET</i>
CNV	<i>HER2</i>
MSI	Punteggio MSI
TMB	Punteggio TMB

Tecnologia collaudata per il rilevamento di biomarcatori a basso livello

Utilizzando il collaudato sequenziamento Illumina mediante chimica di sintesi (SBS), TruSight Oncology 500 ctDNA consente una mappatura genomica esaustiva a partire da soli 30 ng di cfDNA, che lo rende un'alternativa ideale da utilizzare quando non è disponibile l'analisi dei tessuti. La preparazione delle librerie sfrutta la chimica di arricchimento dei target, utilizzando sonde biotilate e microsfere magnetiche coniugate con streptavidina per l'arricchimento di target selezionati da libreria a base di DNA. La chimica di arricchimento per l'ibridazione e la cattura utilizza sonde sufficientemente grandi da conferire un'elevata specificità di legame, ma che consentono comunque l'ibridazione di target contenenti piccole mutazioni. Questo approccio riduce i dropout del campione in presenza sia di variazioni alleliche naturali che di artefatti di sequenziamento.

Poiché il ctDNA rappresenta una piccola frazione del cfDNA, per separare il segnale dal rumore è necessario utilizzare metodi solidi. La preparazione delle librerie comprende identificatori molecolari univoci (UMI) che permettono l'identificazione di varianti a bassissima frequenza.³ Per aumentare la sensibilità, le librerie TruSight Oncology 500 ctDNA sono sequenziate sul sistema NovaSeq 6000 ad alta profondità (400 milioni di letture a circa 35.000x). Il risultato è la capacità di rilevare mutazioni a frequenza di variante allelica pari allo 0,5% (VAF) per le piccole varianti, con una sensibilità analitica del 95% e una specificità analitica > 99,995% (Tabella 3).

Tabella 3. Rilevamento di varianti di basso livello con precisione elevata

Tipo di variante	Sensibilità analitica ^a	Specificità analitica ^b
Piccole varianti (≥ 0,5% VAF)	≥ 95%	≥ 99,995%
Amplificazioni del gene (variazione ≥ 1,4 volte)	≥ 95%	≥ 95%
Delezioni del gene (variazione ≤ 0,6 volte)	≥ 95%	≥ 95%
Fusioni geniche (0,5%)	≥ 95%	≥ 95%
Rilevamento elevato MSI (≥ del 2% della frazione del tumore)	≥ 95%	≥ 95%

a. La sensibilità analitica rappresenta il rilevamento percentuale al livello di variante dichiarato
 b. La specificità analitica rappresenta la capacità di rilevare un negativo noto

Analisi accurata e accelerata

Per vincere le sfide del cfDNA e garantire prestazioni ottimali del saggio, il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA utilizza algoritmi bioinformatici accelerati e completamente integrati. Il software esegue l'allineamento della sequenza, la correzione degli errori mediante il raggruppamento della sequenza e infine l'identificazione delle varianti in base ai dati grezzi. Gli errori di lettura e di sequenziamento duplicati vengono eliminati senza perdere il segnale per le varianti a bassa frequenza, generando risultati di identificazione ad alta sensibilità.

A differenza dei risultati qualitativi dei saggi basati su PCR, il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA fornisce un punteggio quantitativo MSI derivato dai siti dei marcatori MSI a > 2.400 omopolimeri. Per l'analisi TMB, il software DRAGEN ottimizza la sensibilità misurando indel e SNV non sinonimi e sinonimi. Dopo l'identificazione della variante e la correzione degli errori, l'accuratezza della misurazione TMB è ulteriormente migliorata dal filtraggio delle varianti delle linee germinali, delle varianti a bassa affidabilità e delle varianti associate all'emopoiesi clonale a potenziale indefinito.

Il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA viene eseguito su un server Illumina DRAGEN v3 locale. Questa piattaforma ultrarapida offre hardware e software avanzati che permettono di ridurre i tempi di analisi dei dati di circa l'85% o da nove giorni a circa 20 ore (Tabella 4).

PierianDx Clinical Genomics Workspace completa l'analisi terziaria. È sufficiente caricare i file dei report delle varianti direttamente sul cloud Clinical Genomics Workspace. Clinical Genomics Workspace esegue l'annotazione e il filtraggio delle varianti permettendo quindi un'interpretazione e una generazione di report agevolata. Da migliaia di varianti nel genoma, Clinical Genomics Workspace filtra e dà priorità alle varianti rilevanti dal punto di vista biologico per la creazione di report genomici finali automatizzati e personalizzabili. L'intero flusso di lavoro, da cfDNA alla generazione di report consolidati di varianti, richiede solo cinque giorni (Figura 2).

Una convalida estesa fornisce risultati accurati e altamente riproducibili

Per dimostrare i risultati di alta qualità ottenuti con TruSight Oncology 500 ctDNA, Illumina ha condotto diversi studi per valutare la capacità di individuare SNV, CNV, fusioni geniche, TMB e MSI (Figure 3 e 4, Tabelle 5 e 6).

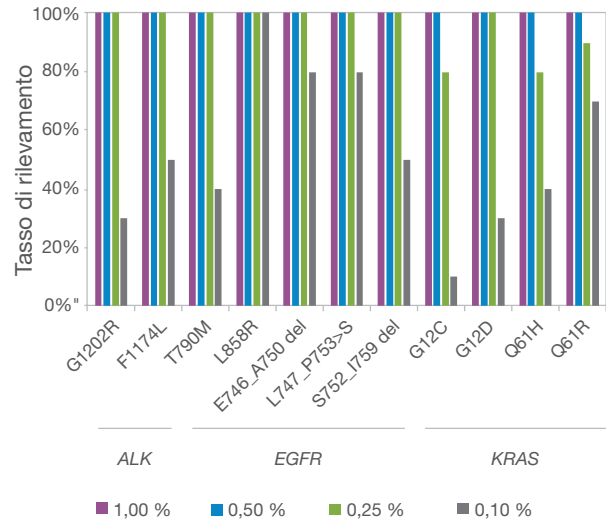


Figura 3. Rilevamento di piccole varianti con VAF basso: i campioni con VAF noto per ciascuna variante sono stati diluiti a valori compresi tra lo 0,10 e l'1,00% di VAF. Sono state analizzate cinque repliche di ciascun campione con TruSight Oncology 500 ctDNA utilizzando 30 ng di DNA di controllo di riferimento commerciale.

Tabella 4. Se il server DRAGEN v3 è in loco, il tempo necessario per l'analisi dei dati si riduce

Fase di analisi dei dati	Soluzione non DRAGEN ^a	Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA
Conversione BCL	6 ore	1 ora
Allineamento + raggruppamento + riallineamento	170 ore	11 ore
Identificazione delle fusioni geniche	10 ore	2 ore
Identificazione delle varianti	24 ore	8 ore
Durata totale	Circa 9 giorni	Circa 20 ore (riduzione di circa l'85%)

a. Pipeline in singolo nodo (128 G di memoria, CPU a 24 core), senza parallelizzazione per 24 campioni usando una cella a flusso S4

* A breve verrà messa a disposizione la versione cloud del software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA.

Riepilogo

TruSight Oncology 500 ctDNA è un saggio multiplex basato su NGS che analizza simultaneamente centinaia di biomarcatori provenienti dal plasma e correlati al tumore. Il contenuto del saggio è allineato alle linee guida e ai trial clinici attuali, ed è in grado di rilevare più tipi di varianti da 523 geni presenti in diversi tipi di tumore, senza la necessità di utilizzare più campioni per test iterativi. TruSight Oncology 500 ctDNA fornisce inoltre una valutazione di biomarcatori immuno-oncologici ed emergenti (TMB, MSI, *NTRK* e *ROS1*). Sfruttando l'ampio contenuto genomico, una tecnologia di sequenziamento leader del settore e un software avanzato, TruSight Oncology 500 ctDNA offre una soluzione integrata per accelerare i progetti di ricerca clinica nel laboratorio con un livello di complessità operativa e analitico minimo.

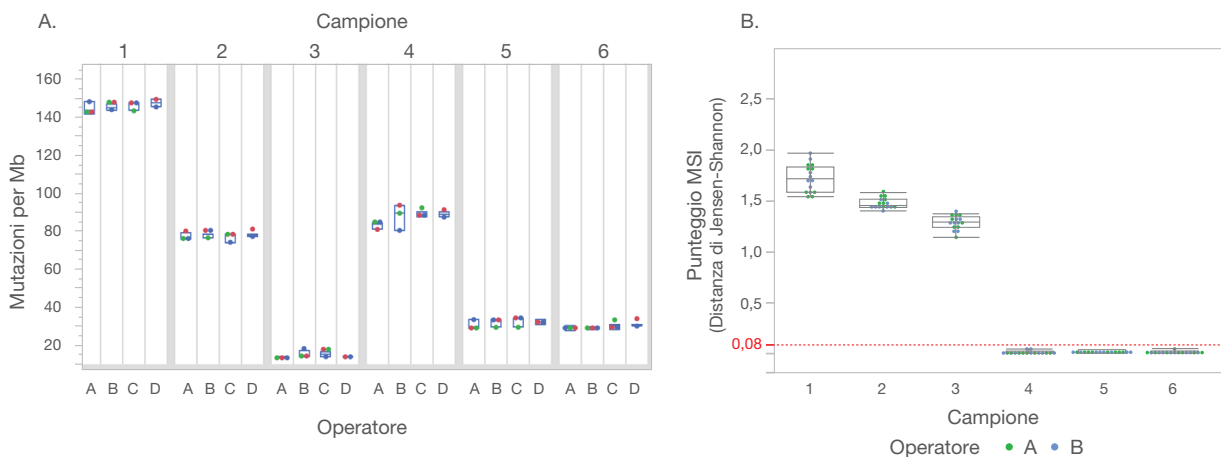


Figura 4. Misurazioni di TMB e MSI riproducibili. (A) Il valore TMB è stato valutato in sei diversi campioni di plasma per quattro operatori in replica. (B) Il valore MSI è stato valutato in tre linee cellulari preparate con nucleosomi con stato MSI elevato noto (1-3) e tre campioni cfDNA estratti da tumori con MSI elevato a bassa prevalenza (4-6) in due diversi operatori (verde, blu).

Tabella 5. Rilevamento sensibile di CNV

Gene	Variazione prevista	Media osservata	Deviazione standard	Tasso di rilevamento
Amplificazioni				
AKT2	1,4	1,4	0,02	100%
BRAF	1,5	1,5	0,01	100%
BRCA2	1,8	1,5	0,01	100%
CCND3	1,5	1,4	0,01	100%
CDK6	1,5	1,5	0,01	100%
FGF14	1,3	1,5	0,01	100%
FGF3	2,1	1,6	0,01	100%
FGF4	1,4	1,2	0,01	100%
FGFR2	1,3	1,5	0,01	100%
MET	1,4	1,5	0,02	100%
MYC	1,7	1,8	0,02	100%
Delezioni				
BRCA1	0,8	0,8	0,01	100%
BRCA2	0,8	0,8	0,01	100%
AR	0,7	0,8	0,01	100%

Campioni con livelli noti di variazione per le amplificazioni e le delezioni dei geni sono stati valutati usando TruSight Oncology 500 ctDNA con 30 ng di input di cfDNA. Sono state analizzate cinque repliche di ciascun campione.

Tabella 6. Rilevamento della fusione genica a basso VAF

Fusione genica	VAF previsto	VAF osservato	Deviazione standard	Tasso di rilevamento
FGFR2-COL14A1	4,1%	4,2%	0,5%	100%
NPM1-ALK	3,4%	0,7%	0,2%	100%
FGFR3-BAIAP2L1	3,4%	0,7%	0,2%	100%
NPM1-ALK	2,4%	0,4%	0,1%	100%
EML4-ALK	1,7%	0,5%	0,1%	100%
CCDC6-RET	1,0%	0,7%	0,1%	100%
FGFR2-COL14A1	0,9%	0,4%	0,1%	100%
EML4-ALK	0,7%	0,2%	0,1%	100%
NCOA4-RET	0,5%	0,1%	0,0%	100%
EML4-ALK	0,5%	0,8%	0,2%	100%
NPM1-ALK	0,5%	0,1%	0,0%	100%
CCDC6-RET	0,2%	0,2%	0,1%	100%

Sono stati valutati campioni con frequenze alleliche di fusione genica note comprese tra circa lo 0,5% e il 4%. Sono state analizzate cinque repliche di ciascun campione con TruSight Oncology 500 ctDNA utilizzando un input di cfDNA pari a 30 ng.

La direzionalità della fusione genica è stata riportata sulla base di un'espressione nota. Per ulteriori informazioni sulla direzionalità della fusione basata su DNA, consultare la TruSight Oncology 500 ctDNA Local App User Guide (Guida per l'utente dell'app locale TruSight Oncology 500 ctDNA).

Maggiori informazioni

Per ulteriori dettagli su TruSight Oncology 500 ctDNA, visitare il sito www.illumina.com/tso500-ctDNA

Per saperne di più sulla piattaforma DRAGEN Bio-IT, visitare la pagina www.illumina.com/DRAGEN

Bibliografia

- Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med.* 2019;25(9):1415-1421.
- Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4691-4700.
- Illumina (2017) TruSight Oncology UMI Reagents. www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-100000050425.pdf. Consultato il 4 maggio 2020.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Quantità	N. di catalogo
Kit TruSight Oncology 500 ctDNA	48 campioni / 16 indici	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit più PierianDx Interpretation Report	48 campioni / 16 indici	20043410
Kit di reagenti NovaSeq		
Kit di reagenti NovaSeq 6000 S2 v1.5	300 cicli	20028314
Kit di reagenti NovaSeq 6000 S4 v1.5	300 cicli	20028312
Kit NovaSeq Xp 4-Lane v1.5	1 kit	20043131
Report sulle varianti in laboratorio		
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 1	Licenza di 1 anno	20042100
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 2	Licenza di 1 anno	20042101
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 3	Licenza di 1 anno	20042102
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 4	Licenza di 1 anno	20042103
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 5	Licenza di 1 anno	20042104
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 6	Licenza di 1 anno	20042105
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 7	Licenza di 1 anno	20042106
Software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA, Livello 8	Licenza di 1 anno	20042107
Server Illumina DRAGEN v3	1 server	20040619
Piano di scambio avanzato server DRAGEN		20032797
Installazione server Illumina DRAGEN		20031995

Illumina • 1.800.809.4566 Numero verde (USA) • +1.858.202.4566 tel. • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2021 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. 1170-2019-006-D ITA QB9370