

TruSight™ Oncology 500 ctDNA v2

CGP sensibile e veloce da
campioni di biopsia liquida

- Rilevamento dei biomarcatori presenti a partire dallo 0,2% di VAF da 20 ng di ctDNA (5-30 ng possibili)
- Ottenimento di risultati completi in meno di quattro giorni con opzioni manuali o automatizzate
- Analisi di oltre 500 geni e firme genomiche di immunoncologia (IO) (MSI, TMB) in un unico saggio
- Utilizzo di un'economia trasformativa e di dimensioni dei batch fino a quattro campioni con NovaSeq™ X Series

illumina®

Il valore del ctDNA e della biopsia liquida per la CGP

La comprensione della base genomica del cancro può contribuire a individuare eventuali alterazioni che stimolano la patologia e favorire i progressi nella medicina di precisione. Una modalità di approccio a tali studi oncologici è la mappatura genomica completa (CGP, Comprehensive Genomic Profiling). La CGP è un'applicazione per la medicina di precisione che sfrutta il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) per valutare un'ampia gamma di biomarcatori in un singolo saggio, utilizzando meno campioni e restituendo i risultati più velocemente rispetto a strategie di test multiple e iterative.^{1,2} Inoltre, i test CGP sono in grado di identificare varianti clinicamente più rilevanti rispetto agli approcci dei test convenzionali, come i test a singolo gene e i pannelli NGS hotspot.³⁻⁶ L'importanza di tale capacità di rilevare più varianti aumenta man mano che viene scoperto un numero maggiore di biomarcatori, comprese le firme genomiche di immuno-oncologica (IO, Immuno-Oncology) come il carico mutazionale del tumore (TMB, Tumor Mutational Burden) la cui identificazione accurata richiede pannelli NGS di grandi dimensioni (oltre 1 Mb).^{7,8}

L'approccio standard per la CGP prevede l'uso di campioni di tessuto tumorale solido, inclusi i campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded). Occasionalmente, potrebbe non essere disponibile una quantità sufficiente di campione di tessuto (ciò può verificarsi fino al 25% dei casi⁹), il tumore potrebbe essere inaccessibile o i risultati della biopsia tissutale potrebbero essere eccessivamente ritardati. In questi casi, l'esecuzione di una CGP con DNA tumorale circolante (ctDNA, circulating tumor DNA) da una biopsia liquida ematica può fornire informazioni sul panorama genomico del tumore. Il ctDNA è stato rilevato in tutti gli stadi della progressione del tumore e in diversi tipi di tumore solido,¹⁰ inclusi i tumori polmonari, mammari, coloretali e ovarici.

L'utilizzo del ctDNA per la CGP offre diversi vantaggi:

- Accesso semplificato al campione mediante una procedura di prelievo di sangue minimamente invasiva¹¹
- Cattura dei cloni di più tumori o persino dello stesso tumore,¹² superando la distorsione di campionamento intrinseca presente nella biopsia del tumore solido e ampliando la capacità di identificare più alterazioni¹²⁻¹⁵
- Recupero di informazioni temporali e spaziali sull'eterogeneità intra-tumorale e inter-tumorale¹¹
- Ripetizione dell'analisi per valutare la selezione clonale

La biopsia liquida costituisce un approccio non invasivo per ottenere DNA libero da cellule (cfDNA, cell-free DNA), incluso il ctDNA, dal plasma ematico per la mappatura del tumore (Figura 1). Per alcune malattie, come il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC, Non-Small Cell Lung Carcinoma), l'aggiunta dell'analisi CGP dalla biopsia liquida all'analisi del tessuto può migliorare l'identificazione di mutazioni clinicamente rilevanti del 15-48%.^{13,14,16} Inoltre, studi sul carcinoma polmonare non a piccole cellule hanno rivelato che le analisi del cfDNA sono altamente concordanti con le analisi basate sul tessuto.¹⁴ Oggi, la biopsia liquida viene sempre più inclusa nelle linee guida professionali (più di 12 patologie) come metodo per ottenere il campione per la mappatura molecolare.¹⁷⁻¹⁹

Per sfruttare al meglio la biopsia liquida, è fondamentale utilizzare un saggio analitico altamente sensibile e specifico, in grado di rilevare mutazioni somatiche presenti a basse frequenze nel cfDNA. Il saggio TruSight Oncology 500 ctDNA originale²⁰ ha affrontato questa sfida, sfruttando le potenzialità della collaudata tecnologia NGS di Illumina e assicurando l'elevata sensibilità analitica necessaria per consentire la CGP. Sulla base di questo successo, TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (Tabella 1, Tabella 2) offre miglioramenti chimici e del flusso di lavoro che garantiscono maggiore sensibilità e velocità di risposta (Figura 6).



Figura 1: la biopsia liquida consente un approccio non invasivo per la CGP. Il ctDNA, presente nel DNA libero da cellule nel plasma, può essere recuperato mediante un semplice prelievo di sangue analizzato con TruSight Oncology 500 ctDNA v2 per rilevare la presenza di biomarcatori rilevanti per il cancro nelle linee guida chiave.

Tabella 1: TruSight Oncology ctDNA v2 in sintesi

Parametro	Specifica
Sistema	NovaSeq X Series NovaSeq 6000 System NovaSeq 6000Dx Instrument (modalità RUO) ^a
Processività dei campioni	4-48 campioni per corsa
Dimensioni del kit per la preparazione delle librerie	24 campioni (manuali) 48 campioni (automatizzati)
Campioni per cella a flusso	4 campioni per cella a flusso 1.5B 8 campioni per cella a flusso S2 24 campioni per cella a flusso 10B 24 campioni per cella a flusso S4
Capacità di automazione	Metodi qualificati Illumina disponibili per Hamilton Microlab STAR
Dimensioni del pannello	1,94 Mb di DNA
Contenuto del pannello	523 geni per varianti piccole 59 geni per CNV 23 geni per riarrangiamenti genici MSI (più di 2.300 loci) TMB (più di 1 Mb)
Tipo di campione	cfDNA derivato dal plasma ematico
Input di DNA richiesto	20 ng di cfDNA (5-30 ng possibili) ^b
Durata totale del saggio	Dalla preparazione della libreria al report sulla variante: • 3 giorni con NovaSeq X Series • 4 giorni con NovaSeq 6000 System
Interventi manuali	8-24 campioni (manuali): circa 2,5 ore 8-24 campioni (automatizzati): circa 1,5 ore 48 campioni (manuali): circa 4,5 ore 48 campioni (automatizzati): circa 1,5 ore
Durata della preparazione delle librerie ^c	8-24 campioni (manuali): circa 8,5 ore 8-24 campioni (automatizzati): circa 9,5 ore 48 campioni (manuali): circa 10 ore 48 campioni (automatizzati): circa 11 ore
Durata della corsa di sequenziamento	22-44 ore (fare riferimento alla Figura 5)
Lunghezza lettura corsa di sequenziamento	2 × 151 bp
Copertura del sequenziamento	35.000 volte
Durata analisi delle varianti	8 campioni: 9-12 ore 24 campioni: 20-24 ore 48 campioni: 40-48 ore

a. Compatibilità del server integrato per NovaSeq 6000Dx Instrument disponibile dalla seconda metà del 2024.

b. Si raccomanda la quantificazione con Agilent TapeStation System o Fragment Analyzer System. Per ulteriori informazioni sulle quantità di input, consultare il documento [Using lower input amounts with TruSight Oncology ctDNA v2 technical note](#).

c. Include la preparazione delle librerie, l'arricchimento e la normalizzazione basata su microsfere.

Tabella 2: prestazioni di TruSight Oncology ctDNA v2^a

Parametro	Specifica
Limite di rilevamento (LOD, Limit Of Detection)	0,2% VAF per SNV 0,5% VAF per MNV e indel 0,5% VAF per riarrangiamenti genici Variazione ≥ 1,3 volte per le amplificazioni geniche Variazione ≤ 0,6 volte per le delezioni geniche ≥ 0,3% della frazione di tumore per MSI
Sensibilità analitica (al LOD)	≥ 90% (al LOD dello 0,2% VAF per SNV) ≥ 95% (al LOD dello 0,2% VAF per gli hotspot SNV) ≥ 95% (al LOD dello 0,5% VAF per tutti gli altri tipi di varianti)
Specificità analitica	≥ 99,999%

a. Verificate con NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Series.

Tabella 3: progressi con TruSight Oncology ctDNA v2

Vantaggio	TruSight Oncology 500 ctDNA v2	TruSight Oncology 500 ctDNA (originale)
Migliore sensibilità del saggio	Separazione delle fasi di riparazione delle estremità e di tailing A	Combinazione di riparazione delle estremità e tailing A
Flusso di lavoro più semplice ed esperienza utente migliorata	Indici basati su piastra/UMI	Indici basati su provetta/UMI
Flusso di lavoro più rapido e in un solo giorno	Singola fase di ibridazione/cattura	Due fasi di ibridazione e cattura
Maggiore scalabilità	192 indici	16 indici
Dimensioni batch più ampie	4-48 campioni ^a	8-48 campioni
Automazione abilitata	Sì	No

a. Batch di quattro campioni disponibili su NovaSeq X Series.

UMI (Unique Molecular Identifier) = identificatore molecolare univoco.

Contenuto esaustivo

Il contenuto di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 è stato progettato con il contributo di autorità riconosciute nella comunità oncologica e include biomarcatori attuali ed emergenti con una copertura esaustiva dei geni coinvolti nelle linee guida chiave e nei trial clinici per diversi tipi di tumore. La sonda del pannello è stata ideata per catturare i riarrangiamenti genici sia noti sia nuovi e comprende 523 geni, così da rilevare le varianti che potrebbero avere un ruolo nella tumorigenesi, oggi e in futuro. I biomarcatori comprendono varianti a singolo nucleotide (SNV, Single-Nucleotide Variant), varianti multinucleotidiche (MNV, Multi-Nucleotide Variant), inserzioni/delezioni (indel), varianti del numero di copie (CNV, Copy-Number Variant), riarrangiamenti genici e firme genomiche IO complesse, come l'instabilità microsatellitare basata sul sangue (bMSI, blood-based Microsatellite Instability) e il TMB basato sul sangue (bTMB, blood-based TMB) (Tabella 4).

 Per un elenco completo dei geni, visitare la [pagina del prodotto TruSight Oncology 500 ctDNA v2](#).

Tabella 4: esempi di tipi di varianti rilevati da TruSight Oncology 500 ctDNA v2

Tipo di variante	Esempio
SNV e indel	<i>EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF</i>
Riarrangiamenti genici	<i>ALK, ROS1, NTRK1, NTRK2, RET</i>
CNV	<i>HER2</i>
MSI	Punteggio MSI
TMB	Punteggio TMB

Flusso di lavoro veloce e integrato

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 fa parte di un flusso di lavoro CGP integrato che inizia con l'input del campione e termina con il report finale (Figura 2). L'utilizzo di kit e metodi automatizzati per la preparazione delle librerie, di strumenti di identificazione di varianti e di software di interpretazione e creazione di report consente un flusso di lavoro fluido che può essere completato in meno di quattro giorni, ovvero in meno della metà del tempo rispetto ad altri saggi di biopsia liquida CGP (Figura 3).

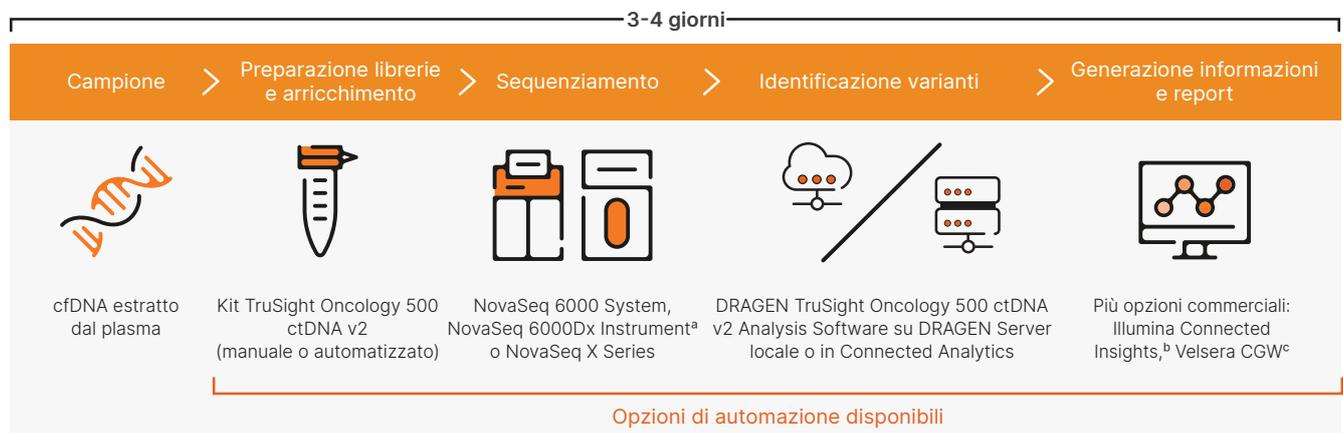


Figura 2: flusso di lavoro di TruSight Oncology 500 ctDNA v2. TruSight Oncology 500 ctDNA v2 si integra nei flussi di lavoro esistenti del laboratorio, il che permette di ottenere un report sulle varianti partendo dal cfDNA in quattro giorni. DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software viene eseguito in locale su un DRAGEN Server o su cloud tramite Illumina Connected Analytics. a. NovaSeq 6000Dx Instrument in modalità RUO. b. Disponibile in Paesi selezionati. La linea di prodotti Illumina Connected Insights supporta l'analisi terziaria definita dall'utente grazie alle chiamate API a contenuti di terze parti. c. Sono disponibili altre opzioni di terze parti.

TruSight Oncology 500 ctDNA v2

3-4 giorni

Kit distribuito 1²¹

5 giorni

Servizio centralizzato 1²²

7 giorni

Kit distribuito 2²³

8 giorni

Figura 3: report più veloci con TruSight Oncology 500 ctDNA v2. Confronto tra le tempistiche necessarie per recuperare report dal campione nel caso di saggi CGP con biopsia liquida che includono i biomarcatori IO di bMSI e bTMB.

Preparazione ottimizzata delle librerie

Utilizzando la comprovata chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) di Illumina, TruSight Oncology 500 ctDNA v2 consente di recuperare la mappatura genomica completa da soli 20 ng di cfDNA, il che rende questa tecnica un'alternativa ideale da utilizzare quando il tessuto non è immediatamente disponibile o in aggiunta all'analisi del tessuto. Il ctDNA rappresenta una piccola porzione del cfDNA (spesso meno del 5% sul totale), che richiede metodi solidi per separare il segnale dal rumore. Per consentire l'identificazione di varianti a bassissima frequenza, il processo di preparazione delle librerie impiega sonde biotinilate e microsferiche magnetiche rivestite con streptavidina per l'arricchimento di target selezionati in librerie basate sul DNA e identificatori molecolari univoci (UMI)²⁴ al fine di ridurre i tassi di errore (Figura 4). Grazie ai progressi compiuti nella chimica dei prodotti, il numero di ibridazioni si è ridotto da due a una in TruSight Oncology 500 ctDNA v2, il che abbrevia il ciclo di preparazione delle librerie a un giorno e abbatte le tempistiche per il recupero dei risultati. Inoltre, è migliorata la sensibilità analitica, che si è ridotta allo 0,2% VAF per le SNV. Questo approccio mirato di ibridazione-cattura riduce i dropout del campione in presenza sia di variazioni alleliche naturali sia di artefatti di sequenziamento.



Ulteriori informazioni sull'**utilizzo di quantità di input fino a 5 ng con TruSight Oncology ctDNA v2**.



Ulteriori informazioni sugli **UMI**.

Flusso di lavoro compatibile con l'automazione

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 offre opzioni manuali e automatizzate per supportare la preparazione scalabile delle librerie. Illumina ha collaborato con Hamilton, produttore leader di soluzioni per la manipolazione di liquidi, al fine di produrre un flusso di lavoro completamente automatizzato per i saggi TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su Hamilton Star. I kit per la preparazione delle librerie che consentono una facile automazione forniscono una quantità sufficiente di reagenti per la preparazione di 48 librerie e per adattarsi al volume morto richiesto per il robot con un minimo scarto di reagente. I flussi di lavoro automatizzati ottengono gli stessi risultati di alta qualità prodotti dai protocolli manuali, riducendo al contempo gli interventi manuali del 40%, liberando circa otto ore per altre attività di laboratorio. Nel complesso, l'automazione consente ai laboratori di risparmiare sui costi di manodopera e migliorare l'efficienza.²⁶

Sequenziamento efficace

Le librerie TruSight Oncology 500 ctDNA v2 sono sequenziate con NovaSeq 6000 Sequencing System, NovaSeq 6000Dx Instrument (modalità RUO)* o con NovaSeq X Series. NovaSeq X Series offre un flusso di lavoro più veloce, riducendo i tempi di sequenziamento di circa il 40% rispetto a NovaSeq 6000 System (Tabella 5). Indipendentemente dalla piattaforma utilizzata, il sequenziamento avviene ad alta profondità (400 milioni di letture per campione a un valore di circa 35.000 volte) per migliorare la sensibilità. Il risultato è la capacità di rilevare mutazioni allo 0,2% di frequenza allelica delle varianti (VAF, Variant Allele Frequency) per le SNV, con sensibilità analitica pari o superiore al 90% e specificità analitica pari o superiore al 95% (Tabella 6). Inoltre, NovaSeq X Series offre un'economia trasformativa riducendo il costo del sequenziamento per campione.²⁷

* Sequenziamento con NovaSeq 6000Dx Instrument disponibile nella seconda metà del 2024.

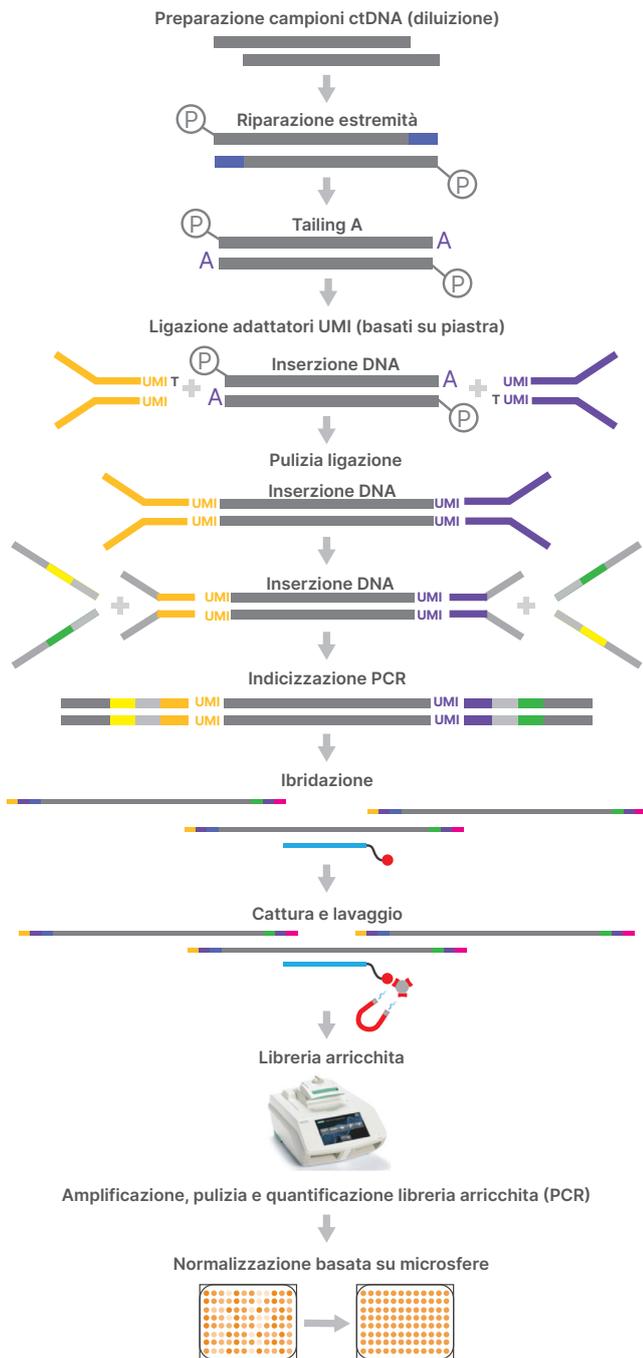


Figura 4: preparazione delle librerie per ibridazione-cattura basata su UMI. L'arricchimento mirato utilizza sonde sufficientemente grandi da conferire un'elevata specificità di legame, pur consentendo l'ibridazione di target contenenti mutazioni. I reagenti UMI riducono i tassi di errore, aumentando la specificità analitica e generando identificazioni di varianti con maggiore affidabilità.²⁵

Tabella 5: durata stimata delle corse di sequenziamento

Sistema	NovaSeq 6000 System ^a		NovaSeq X Series	
	S2	S4	1.5B	10 miliardi
Cella a flusso				
N. di campioni	Durata della corsa di sequenziamento (n. di celle a flusso)			
4	–	–	22 ore (1)	–
8	36 ore (1)	–	22 ore (2)	–
24	–	44 ore (1)	–	25 ore (1)
48	–	44 ore (2)	–	25 ore (2)

a. La durata delle corse di sequenziamento si applica a NovaSeq 6000Dx Instrument in modalità RUO.

Tabella 6: rilevamento accurato di biomarcatori a basso livello^a

Tipo di variante	Sensibilità analitica ^b	Specificità analitica ^c
Varianti a nucleotide piccole (≥ 0,2% VAF)	≥ 90%	≥ 99,9994%
Varianti multinucleotidiche (≥ 0,5% VAF)	≥ 90%	≥ 95%
Inserzioni/delezioni (≥ 0,5% VAF)	≥ 90%	≥ 95%
Amplificazioni geniche (variazione ≥ 1,3 volte)	≥ 95%	≥ 95%
Delezioni geniche (variazione ≤ 0,6 volte)	≥ 95%	≥ 95%
Riarrangianti genici (≥ 0,5%)	≥ 95%	≥ 95%
Rilevamento elevato MSI (≥ allo 0,3% della frazione del tumore)	≥ 95%	≥ 95%

a. Prestazioni verificate con NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Series.

b. La sensibilità analitica è definita come percentuale di rilevamento al livello di variante dichiarato.

c. La specificità analitica è definita come la capacità di rilevare un negativo noto.

Analisi accurata e accelerata

Identificazione di varianti completa ed efficiente

La pipeline DRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis utilizza algoritmi di bioinformatica accelerati e completamente integrati per allineare la sequenza, correggere gli errori comprimendo la sequenza e identificare le varianti in base ai dati non elaborati.

Le letture duplicate e gli errori di sequenziamento vengono rimossi senza perdere il segnale per le varianti a bassa frequenza, il che produce risultati di identificazione di varianti ad alta sensibilità.

A differenza dei risultati qualitativi dei saggi basati su PCR, la pipeline DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis fornisce un punteggio bMSI quantitativo derivato da oltre 2.300 siti marker MSI omopolimerici. Per l'analisi bTMB, la pipeline DRAGEN ottimizza la sensibilità misurando indel e SNV sia non sinonime sia sinonime. Dopo l'identificazione di varianti e la correzione degli errori, l'accuratezza della misurazione bTMB viene ulteriormente migliorata filtrando le varianti della linea germinale, le varianti a bassa affidabilità e le varianti associate all'emopoiesi clonale a potenziale indeterminato.

La pipeline DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis viene eseguita in locale su un Illumina DRAGEN Server v4 oppure su cloud tramite Illumina Connected Analytics (ICA). ICA offre opzioni per il trasferimento automatizzato dei dati e l'avvio dell'analisi, nonché una piattaforma genomica sicura basata sul cloud per ampliare l'analisi secondaria senza la necessità di acquisire e mantenere l'infrastruttura locale.²⁸ Hardware e software DRAGEN migliorati riducono i tempi di analisi dei dati di circa l'85% (Tabella 7).

Tabella 7: riduzione delle tempistiche di analisi dei dati per 24 campioni utilizzando una cella a flusso S4

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

a. Nodo singolo (128 G di memoria, CPU a 24 core), pipeline senza parallelizzazione.

Interpretazione ottimizzata dei dati

Dopo l'identificazione della classe delle varianti e del tipo di biomarcatore tramite l'analisi secondaria, la fase successiva consiste nell'interpretare i dati per estrarre il significato biologicamente rilevante. È possibile utilizzare Illumina Connected Insights,[†] Velsera Clinical Genomics Workspace e app di terze parti.

I file di identificazione di varianti prodotti localmente o tramite il cloud con Illumina Connected Analytics possono essere automaticamente inseriti in Illumina Connected Insights. Se combinato con l'integrazione del sistema di sequenziamento e con le funzionalità di avvio automatico di Connected Analytics, il flusso di lavoro di analisi può essere completamente automatizzato con Connected Insights, eliminando la necessità di trasferimenti manuali dei dati e generando un report finale personalizzabile.

Risultati affidabili e riproducibili

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 offre il rilevamento sensibile delle varianti genomiche e dei biomarcatori in un campione di cfDNA, anche se presente a bassi livelli. Per dimostrare l'elevata qualità dei risultati ottenuti con TruSight Oncology 500 ctDNA v2, Illumina ha condotto diversi studi per valutare la capacità di individuare piccole varianti di DNA, CNV, riarrangiamenti genici, TMB e MSI. I risultati delle prestazioni sono stati verificati con NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Series.

SNV e indel

Uno dei vantaggi della chimica di arricchimento dei target è rappresentato dall'utilizzo di sonde sufficientemente grandi da impartire un'elevata specificità di legame, che consente anche l'ibridazione di target contenenti piccole mutazioni. Poiché le SNV sono state associate alla suscettibilità al cancro in vari tipi di tumore, è fondamentale che qualsiasi metodo CGP sia in grado di rilevare queste varianti a bassi livelli. TruSight Oncology 500 ctDNA v2 rileva in modo riproducibile SNV e indel presenti a livelli bassi fino allo 0,2% o allo 0,5% VAF rispettivamente (Figura 5 e Figura 6).

[†] Non disponibile in tutti i Paesi. Illumina Connected Insights supporta l'analisi terziaria definita dall'utente grazie alle chiamate API a fonti di contenuti di terze parti.

CNV

Le variazioni del numero di copie nei geni e nei tipi di tumore sono state associate alla tumorigenesi.²⁸ TruSight Oncology 500 ctDNA v2 include l'analisi di 59 geni associati a CNV e può identificare le amplificazioni con un limite di rilevamento a un valore pari o superiore a 1,3 volte per le amplificazioni e pari o inferiore a 0,6 per le delezioni (Tabella 8).

Tabella 8: prestazioni analitiche di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 per CNV

Gene	Variazione prevista	Variazione osservata	Tasso di rilevamento
Amplificazioni			
<i>ERBB2</i>	1,5	1,50	100%
<i>MET</i>	1,5	1,55	100%
<i>MYC</i>	1,5	1,27	100%
<i>ERBB2</i>	1,4	1,73	100%
<i>MET</i>	1,4	1,46	100%
<i>MYC</i>	1,4	1,22	100%
<i>ERBB2</i>	1,3	1,35	100%
<i>MET</i>	1,3	1,38	100%
<i>MYC</i>	1,3	1,19	8%
<i>ERBB2</i>	1,2	1,19	100%
<i>MET</i>	1,2	1,22	100%
<i>MYC</i>	1,2	N/A	0
Delezioni			
<i>BRCA1</i>	0,85	0,86	16%
<i>BRCA2</i>	0,85	N/A	0
<i>BRCA1</i>	0,80	0,79	100%
<i>BRCA2</i>	0,80	0,80	100%
<i>BRCA1</i>	0,70	0,69	100%
<i>BRCA2</i>	0,70	0,69	100%

I campioni con variazioni note per le amplificazioni geniche mediante controlli sintetici e linee cellulari per le delezioni sono stati valutati utilizzando TruSight Oncology 500 ctDNA v2. Le CNV sono state diluite a tre livelli di VAF. LOD con variazione pari o superiore a 1,3 volte per le amplificazioni geniche e pari o inferiore a 0,6 per le delezioni. Si noti la forte correlazione tra le variazioni previste e quelle osservate. I dati mostrati sono relativi al sequenziamento con NovaSeq 6000 System; prestazioni simili sono state osservate con NovaSeq X Series.

Riarrangiamenti genici

I riarrangiamenti genici possono fungere da driver genomici per il cancro, il che rende essenziale la capacità di rilevarli per gli studi che si concentrano sulla comprensione delle basi della malattia. TruSight Oncology 500 ctDNA v2 rileva e caratterizza i riarrangiamenti genici indipendentemente dal partner, anche se presenti a basse concentrazioni (Tabella 9).

Tabella 9: prestazioni analitiche di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 per riarrangiamenti genici

Fusione	VAF prevista	VAF osservata	Tasso di rilevamento
<i>ALK:EML4</i>	0,60%	0,48%	100%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0,60%	0,39%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0,60%	0,31%	100%
<i>ALK:EML4</i>	0,50%	0,43%	100%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0,50%	0,33%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0,50%	0,27%	100%
<i>ALK:EML4</i>	0,40%	0,36%	100%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0,40%	0,24%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0,40%	0,19%	100%
<i>ALK:EML4</i>	0,20%	0,18%	88%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0,20%	0,11%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0,20%	0,12%	83%

I campioni con tre fusioni di DNA note diluite a livelli di VAF che vanno dallo 0,2% allo 0,6% sono stati valutati con TruSight Oncology 500 ctDNA v2. LOD per riarrangiamenti genici = 0,5%. La valutazione basata su NGS tramite TruSight Oncology 500 ctDNA v2 interroga oltre 2.300 siti di omopolimeri di dimensioni comprese tra 6 e 7 bp, favorendo la riduzione dei tassi di errore e dei potenziali falsi positivi comunemente riscontrati nel sequenziamento degli omopolimeri. I dati mostrati sono relativi al sequenziamento con NovaSeq 6000 System; prestazioni simili sono state osservate con NovaSeq X Series. VAF = frequenza allelica delle varianti.

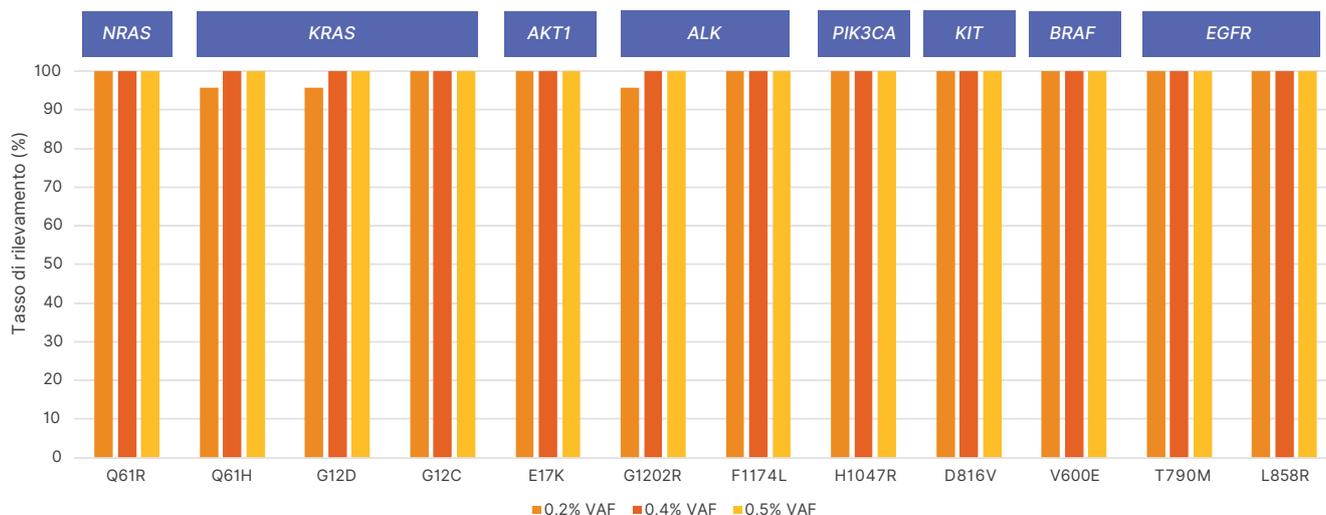


Figura 5: prestazioni analitiche elevate per SNV chiave al LOD (0,2% VAF). I campioni di controllo sintetico con VAF nota per ciascuna variante a singolo nucleotide sono stati diluiti a valori compresi tra lo 0,20% e lo 0,50% VAF e analizzati con TruSight Oncology 500 ctDNA v2. Le SNV presenti a livelli bassi fino allo 0,2% sono risultate rilevabili. I dati mostrati sono relativi al sequenziamento con NovaSeq 6000 System; prestazioni simili sono state osservate con NovaSeq X Series.

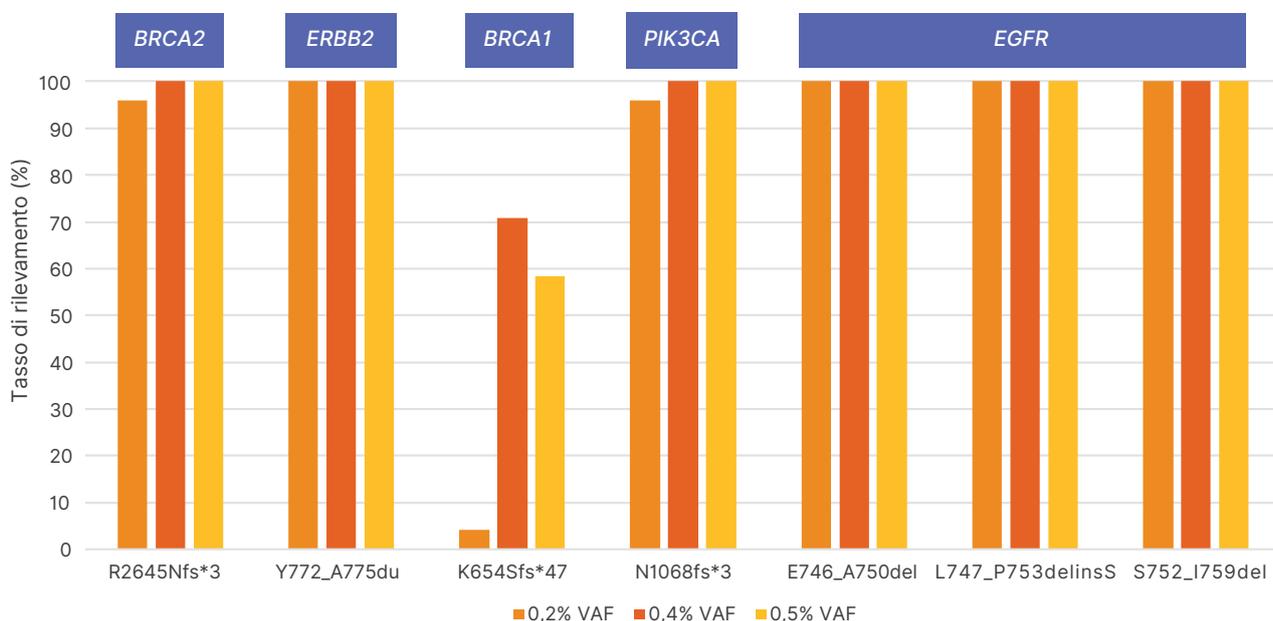


Figura 6: prestazioni analitiche elevate per indel al LOD (0,5% VAF). I campioni di controllo sintetico con VAF nota per ciascuna inserzione o delezione sono stati diluiti a valori compresi tra lo 0,20% e lo 0,50% VAF e analizzati con TruSight Oncology 500 ctDNA v2. Il rilevamento di BRCA1 era inferiore perché la variante si trovava in una regione altamente omopolimerica, con conseguente livello elevato di rumore di fondo. I dati mostrati sono relativi al sequenziamento con NovaSeq 6000 System; prestazioni simili sono state osservate con NovaSeq X Series.

Firme del gene IO: MSI e TMB

Il rilevamento di MSI e TMB si basa sull'analisi di più loci genomici. La valutazione basata su NGS con TruSight Oncology 500 ctDNA v2 interroga oltre 2.300 siti di omopolimeri di dimensioni comprese tra 6 e 7 bp, favorendo la riduzione dei tassi di errore e i potenziali falsi positivi comunemente riscontrati nel sequenziamento degli omopolimeri.²⁸ Grazie alla chimica di preparazione delle librerie sensibili combinata alla bioinformatica avanzata, TruSight Oncology 500 ctDNA v2 fornisce il rilevamento MSI ottenuto fino allo 0,3% della frazione tumorale (Figura 7).

Il recupero di un valore bTMB preciso e riproducibile a bassi livelli di mutazione può essere difficile con pannelli più piccoli.⁷ TruSight Oncology 500 ctDNA v2 combina un contenuto genomico completo a un pannello da 1,94 Mb e sofisticati algoritmi informatici per fornire stime accurate di bTMB. La pipeline di bioinformatica brevettata DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA applica un filtraggio avanzato per le varianti di ematopoiesi sia della linea germinale sia clonale, creando flussi di lavoro altamente concordanti solo per il tumore e normale per il tumore ($R^2 = 0,992$) (Figura 8).²⁹

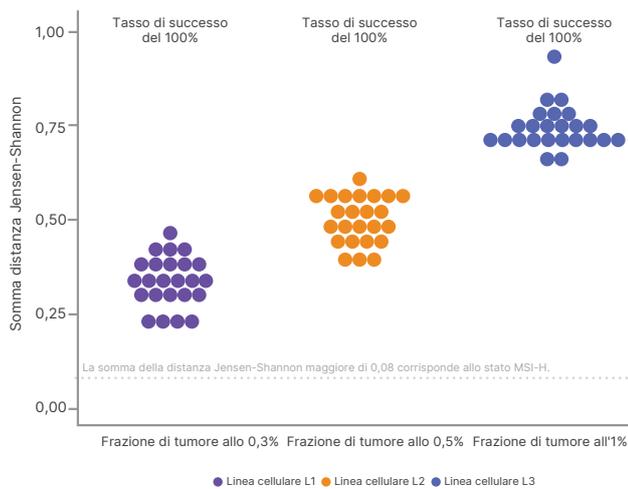


Figura 7: prestazioni MSI sensibili per la ricerca IO. Frazioni tumorali prodotte titolando le linee cellulari preparate nucleosomali con punteggi MSI-H precedentemente noti titolati in background cellulare wild-type. L'elevata sensibilità analitica MSI si ottiene con il DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1 Analysis Software proprietario. Sono stati valutati più di 2.300 siti di omopolimeri. I dati mostrati sono relativi al sequenziamento con NovaSeq 6000 System. Prestazioni simili sono state osservate con NovaSeq X Series.

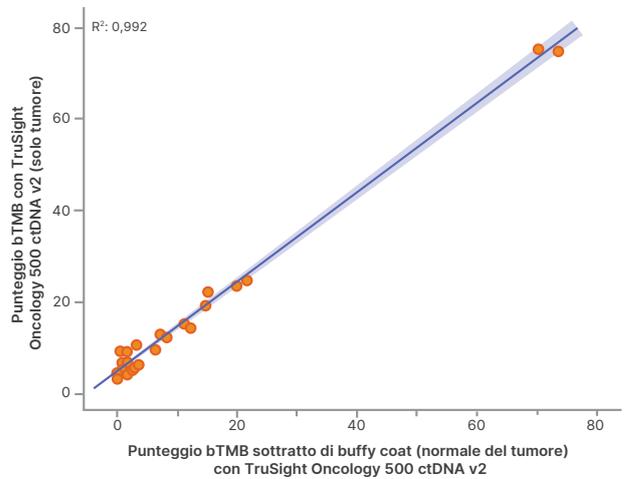


Figura 8: elevata correlazione dei dati bTMB tra i flussi di lavoro di analisi solo per il tumore e normali per il tumore. I punteggi bTMB solo per il tumore prodotti con TruSight Oncology 500 ctDNA v2 con bioinformatica avanzata e un pannello sufficientemente grande da rilevare TMB (più di 1 Mb) mostrano un'elevata concordanza con i punteggi bTMB prodotti da un flusso di lavoro normale del tumore accoppiato utilizzando cfDNA di plasma e buffy coat. I dati mostrati sono relativi al sequenziamento con NovaSeq 6000 System; prestazioni simili sono state osservate con NovaSeq X Series.

Attributi avanzati del prodotto

Illustra offre livelli elevati di assistenza e supporto per garantire il corretto funzionamento del laboratorio. Per consentire una maggiore efficienza, TruSight Oncology 500 ctDNA v2 offre le seguenti funzionalità:

- Notifica avanzata delle modifiche: Illustra informa i laboratori sei mesi prima che vengano apportate modifiche significative a TruSight Oncology 500 ctDNA.
- Certificato di analisi[‡]: ogni TruSight Oncology 500 ctDNA v2 viene rilasciato con un certificato di analisi (CoA, certificate of analysis) dal reparto Quality Assurance di Illustra che accerta che il prodotto ha soddisfatto le specifiche e la qualità predeterminate per il rilascio del prodotto.
- Maggiore durata di conservazione: la durata di conservazione minima garantita per i reagenti TruSight Oncology 500 ctDNA v2 viene estesa a sei mesi, riducendo il rischio di scadenza del prodotto e consentendo ai laboratori di utilizzare i reagenti in base alle reali esigenze di analisi.
- Spedizioni in singoli lotti: al momento disponibili per i kit manuali e disponibili nella seconda metà del 2024 per i kit di automazione, le spedizioni in singoli lotti riducono il carico di qualificazione dei lotti e i test di controllo qualità in entrata.

Soluzione integrata che consente la CGP dalla biopsia liquida

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 è un saggio di ricerca multiplex basato su NGS che analizza simultaneamente centinaia di biomarcatori correlati al cancro in linea con le linee guida attuali e la ricerca dai trial clinici dai campioni di plasma. Il saggio completo rileva un numero maggiore di varianti nel sangue da 523 geni implicati in vari tipi di tumore e valuta biomarcatori emergenti e IO (bTMB, bMSI, *NTRK* e *ROS1*), senza la necessità di più campioni per l'analisi iterativa.

[‡] CoA disponibile nel 2024.

I miglioramenti chimici e la maggiore compatibilità del sistema di sequenziamento hanno ridotto il tempo di risposta complessivo a meno di 3-4 giorni, hanno diminuito il requisito di input a 20 ng di cfDNA e abbassato il limite di rilevamento allo 0,2% VAF (per SNV). Inoltre, il flusso di lavoro compatibile con l'automazione riduce gli interventi manuali e diminuisce il carico per il personale di laboratorio, ottimizzando le procedure di laboratorio per una maggiore efficienza. Grazie al contenuto genomico esteso, alla tecnologia di sequenziamento leader del settore e al software avanzato, TruSight Oncology 500 ctDNA v2 offre una soluzione integrata che consente progetti di ricerca clinica basati sulla CGP con una complessità operativa e di analisi minima.

Maggiori informazioni

[TruSight Oncology 500 ctDNA v2](#)

[NovaSeq X Series](#)

[NovaSeq 6000 System](#)

[NovaSeq 6000Dx Instrument](#)

[Analisi secondaria DRAGEN](#)

[Illustra Connected Analytics](#)

[Illustra Connected Insights](#)

Informazioni per gli ordini: kit di preparazione della libreria (manuali)

Prodotto	N. di catalogo
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (24 samples)	20105899
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for use with NovaSeq 6000 S2 (24 samples)	20105901
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for use with NovaSeq 6000 S4 (24 samples)	20105902
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (24 samples) plus Velsera Interpretation Report	20105905
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (24 samples)	20105907
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (24 samples)	20105908
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (24 samples) plus Connected Insights Interpretation Report	20105911
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (24 samples)	20105913
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (24 samples)	20105914

Informazioni per gli ordini: kit di preparazione delle librerie (automatizzati)

Prodotto	N. di catalogo
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for Automation (48 samples)	20105900
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit, for use with NovaSeq 6000 S2 (48 samples)	20105903
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit, for use with NovaSeq 6000 S4 (48 samples)	20105904
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for Automation (48 samples) plus Velsera Interpretation Report	20105906
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (48 samples)	20105909
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (48 samples)	20105910
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for Automation (48 samples) plus Connected Insights Interpretation Report	20105912
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (48 samples)	20105915
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (48 samples)	20105916

Informazioni per gli ordini: adattatori indice

Prodotto	N. di catalogo
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034701
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034702
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set A for Automation	20066404
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set B for Automation	20063213

Informazioni per gli ordini: reagenti per il sequenziamento

Prodotto	N. di catalogo
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028312
NovaSeq™ X Series 1.5B Reagent Kit (300 cycles)	20104705
NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (300 cycles)	20085594

Informazioni per gli ordini: analisi

Prodotto	N. di catalogo
Creazione di report in locale per le varianti	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina DRAGEN Server Installation	20031995
Illumina DRAGEN Server v4 Support Plan	20085832
Field Delivered Applications Training	15032919
Creazione di report sulle varianti basata sul cloud	
ICA Basic Annual Subscription	20044874
ICA Professional Annual Subscription	20044876
ICA Enterprise Annual Subscription	20038994
ICA Enterprise Compliance Add-on	20066830
Subscription ICA Training and Onboarding	20049422
Interpretazione delle varianti	
Illumina Connected Insights - Annual Subscription	20090137
Illumina Connected Insights-Research - Annual Subscription	20112516
Illumina Connected Insights - Oncology Genome Equivalent Samples (VCF)	20090138
Illumina Connected Insights Training - Remote	20092376
Informatics Professional Services	20071787
Archiviazione su cloud	
Illumina Analytics - 1 iCredit	20042038
Illumina Analytics Starter Package - 1,000 iCredits	20042039
Illumina Analytics - 5,000 iCredits	20042040
Illumina Analytics - 50,000 iCredits	20042041
Illumina Analytics - 100,000 iCredits	20042042

Bibliografia

1. Lim C, Tsao MS, Le LW, et al. Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1415-1421. doi:10.1093/annonc/mdv208.
2. Yu TM, Morrison C, Gold EJ, Tradonsky A, Layton AJ. Multiple Biomarker Testing Tissue Consumption and Completion Rates With Single-gene Tests and Investigational Use of OncoPrint Dx Target Test for Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Single-center Analysis. *Clin Lung Cancer*. 2019;20(1):20-29.e8. doi:10.1016/j.clcc.2018.08.010.
3. Reitsma M, Fox J, Borre PV, et al. Effect of a Collaboration Between a Health Plan, Oncology Practice, and Comprehensive Genomic Profiling Company from the Payer Perspective. *J Manag Care Spec Pharm*. 2019;25(5):601-611. doi:10.18553/jmcp.2019.18309
4. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients [published correction appears in Nat Med. 2017 Aug 4;23 (8):1004]. *Nat Med*. 2017;23(6):703-713. doi:10.1038/nm.4333.
5. Kopetz S, Mills Shaw KR, Lee JJ, et al. Use of a Targeted Exome Next-Generation Sequencing Panel Offers Therapeutic Opportunity and Clinical Benefit in a Subset of Patients With Advanced Cancers. *JCO Precis Oncol*. 2019;3:PO.18.00213. Pubblicato l'8 marzo 2019. doi:10.1200/PO.18.00213.
6. Drilon A, Wang L, Arcila ME, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3631-3639. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2683
7. Buchhalter I, Rempel E, Endris V, et al. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *Int J Cancer*. 2019;144(4):848-858. doi:10.1002/ijc.31878.
8. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):34. Pubblicato il 19 aprile 2017. doi:10.1186/s13073-017-0424-2.
9. Hagemann IS, Devarakonda S, Lockwood CM, et al. Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2015;121(4):631-639. doi:10.1002/cncr.29089.
10. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094.
11. Saarenheimo J, Eigeliene N, Andersen H, Tiirola M, Jekunen A. The Value of Liquid Biopsies for Guiding Therapy Decisions in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:129. doi:10.3389/fonc.2019.00129.
12. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:211-222. Pubblicato il 1° giugno 2016. doi:10.1016/j.csbj.2016.05.004.
13. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(2):173-180. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4305.
14. Leigh 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. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0624.
15. Palmero R, Taus A, Viteri S, et al. Biomarker Discovery and Outcomes for Comprehensive Cell-Free Circulating Tumor DNA Versus Standard-of-Care Tissue Testing in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JCO Precision Oncology*. 2021;5:93-102. doi:10.1200/PO.20.00241.
16. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer*. 2020;126(14):3219-3228. doi:10.1002/cncr.32876.
17. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2021;16(10):1647-1662. doi:10.1016/j.jtho.2021.06.017.
18. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020;31(11):1491-1505. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014
19. Pascual J, Attard G, Bidard FC, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2022;33(8):750-768. doi:10.1016/j.annonc.2022.05.520.
20. Illumina. TruSight Oncology 500 ctDNA data sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843.pdf). Consultato il 20 settembre 2023.
21. Roche. AVENIO ctDNA Analysis Kits. Sequencing. [sequencing.roche.com/us/en/products/product-category/avenio-ctdna-analysis-kits.html](https://www.sequencing.roche.com/us/en/products/product-category/avenio-ctdna-analysis-kits.html). Consultato il 20 settembre 2023.

22. Tempus. Tempus xF. www.tempus.com/oncology/genomic-profiling/xf/. Consultato il 20 settembre 2023.
23. Personal Genome Diagnostics. PGDx elio plasma complete. <https://www.personalgenome.com/products/elio-plasma-complete>. Consultato il 20 settembre 2023.
24. Illumina. TruSight Oncology UMI Reagents data sheet. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf. Consultato il 20 settembre 2023.
25. Illumina. Sequencing accuracy with Unique Molecular Identifiers. illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/multiplexing/unique-molecular-identifiers.html. Consultato il 20 settembre 2023.
26. Socea JN, Stone VN, Qian X, Gibbs PL, Levinson KJ. Implementing laboratory automation for next-generation sequencing: benefits and challenges for library preparation. *Front Public Health*. 2023;11:1195581. doi:10.3389/fpubh.2023.1195581.
27. Dati in archivio. Illumina, Inc. 2024.
28. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899-905. doi:10.1038/nature08822.
29. Illumina. Analysis of TMB and MSI status with TruSight Oncology 500 application note. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/trusight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf. Consultato il 20 settembre 2023.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 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.

M-GL-02196 ITA v4.0