

# TruSight™ Oncology 500 ctDNA

Umfassendes genomisches  
Profiling anhand von  
Liquid-Biopsy-Proben für  
Forschungsanwendungen

- Nutzung mit minimalinvasiven Verfahren gewonnener Blutproben ergänzend oder alternativ (wenn Gewebe nicht ohne Weiteres verfügbar ist) zur Gewebebiopsie
- Analyse von DNA-Biomarkern aus über 500 Genen sowie immunonkologischen Signaturen wie TMB (Tumor Mutational Burden, Tumormutationslast) und MSI (Mikrosatelliteninstabilität)
- Arbeit mit geringen Nachweisgrenzen dank UMI-basierter (Unique Molecular Identifiers, eindeutige molekulare Identifikatoren) Bibliotheksvorbereitung mit Hybriderfassungsschemie sowie Deep Sequencing auf dem NovaSeq™ 6000 System
- Mit einer proprietären DRAGEN™-Pipeline und integrierter Tertiäranalyse von Pierian in fünf Tagen von der cfDNA zur Berichtsauswertung



## Einleitung

Die Liquid Biopsy ermöglicht die umfassende Analyse zirkulierender zellfreier DNA (cfDNA, Cell-free DNA) aus Plasma und bietet damit einen nichtinvasiven Ansatz für das Profiling solider Tumoren. Um die Vorteile der Liquid Biopsy nutzen zu können, ist ein hochgradig sensitiver und spezifischer Analyse-Assay erforderlich, der somatische Mutationen bei niedriger Variantenhäufigkeit erkennt. TruSight Oncology 500 ctDNA bietet diese hohe analytische Sensitivität anhand der Leistung bewährter Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) von Illumina und ermöglicht das umfassende genomische Profiling zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA, Circulating Tumor DNA) aus cfDNA (Abbildung 1, Tabelle 1). Die Kombination dieser fortschrittlichen Forschungslösung mit der Bioinformatikleistung der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software gibt Wissenschaftlern in der klinischen Forschung eine DNA-zu-Bericht-Lösung an die Hand, mit der sich in einem einzigen Assay mehrere Variantentypen Hunderter Gene auswerten lassen (Abbildung 2).

TruSight Oncology 500 ctDNA ist kompatibel mit NovaSeq 6000 v1.5-Sequenzierungsreagenzien. Zusätzlich zur höheren Betriebseffizienz, die die Kosten je Probe um über 35 % verringern kann, zeichnen sich diese Reagenzien durch eine verlängerte Haltbarkeit von sechs Monaten sowie verbesserte Q30-Scores aus.<sup>1</sup>

## Vorteile der Liquid Biopsy

Im Gegensatz zur Gewebebiopsie, die nur Informationen zu einem Teil des Tumors liefert, bietet die Liquid Biopsy Erkenntnisse über die Intra- und Intertumorheterogenität im gesamten Körper. Studien zeigen, dass sich mit der cfDNA-Analyse zahlreiche in Richtlinien empfohlene Biomarker und Resistenzänderungen bestimmen lassen, die mit Gewebebiopsien nicht ermittelt werden können.<sup>2</sup> Zusätzlich hat eine Studie zu nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen ergeben, dass cfDNA-Analysen sich durch eine hohe Übereinstimmung mit gewebebasierten Analysen auszeichnen.<sup>3</sup>

## Eine Basis mit umfassendem Inhalt

Der Inhalt von TruSight Oncology 500 ctDNA wurde unter Einbeziehung anerkannter Experten im Bereich Onkologie entwickelt und umfasst aktuelle sowie neue Biomarker mit umfassender Coverage von Genen, die in wichtigen Richtlinien und klinischen Studien für zahlreiche Tumorarten enthalten sind. Das Panelsondendesign erfasst sowohl bekannte als auch neue Genfusionen und umfasst 523 Gene zur Bestimmung von Varianten, die wahrscheinlich zur Tumorgenese beitragen. Die Biomarker enthalten Einzelnukleotidvarianten (SNVs, Single-Nucleotide Variants), Insertionen/Deletionen (Indels), Kopienzahlvarianten (CNVs, Copy-Number Variants), Genfusionen und komplexe genomische Immunonkologie-Signaturen wie Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Tumormutationslast (TMB) (Tabelle 2).


 Eine vollständige Genliste finden Sie unter [illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html](https://illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html).



Abbildung 1: Liquid Biopsy ermöglicht das Profiling von Biomarkern für zahlreiche Varianten und Krebsarten: Komplexe Varianten-Calling-Algorithmen und eine hohe Sequenzierungstiefe ermöglichen die Erkennung wichtiger Biomarker in cfDNA mit einer Nachweisgrenze (LOD, Limit of Detection) von 0,5 %.

Tabelle 1: TruSight Oncology 500 ctDNA im Überblick

Parameter	TruSight Oncology 500 ctDNA
System	NovaSeq 6000 System
Panelgröße	1,94 Mb DNA
Panelinhalt	523 Gene 59 Gene für CNVs 23 Gene für Genfusionen MSI (> 2.400 Loci) TMB
Erforderliche DNA-Zugabe	30 ng cfDNA <sup>a</sup>
Probentyp	Aus Blut gewonnene cfDNA
Assay-Zeit insgesamt	5 Tage von der Bibliotheksvorbereitung bis zum Variantenbericht
Laufzeit der Sequenzierung	36 h Lauf, 10 h Analyse (S2-Fließzelle) 45 h Lauf, 22 h Analyse (S4-Fließzelle)
Sequenzierungslauf	2 × 151 bp
Probendurchsatz	8 Proben je Lauf (S2-Fließzelle) 24 Proben je Lauf (S4-Fließzelle) 48 Proben je Bibliotheksvorbereitungskit
Nachweisgrenze	0,5 % VAF für kleine Varianten ≥ 1,4-fache Änderung für Genamplifikationen ≤ 0,6-fache Änderung für Gendeletionen ≥ 2 % Tumorfraktion für MSI
Analytische Sensitivität	≥ 95 % (bei Nachweisgrenze für alle Variantentypen)
Analytische Spezifität	≥ 95 %

a. Quantifizierung mit dem System Agilent TapeStation oder Fragment Analyzer empfohlen

Tabelle 2: Beispiele für mit TruSight Oncology 500 ctDNA bestimmte Varianten

Variantentyp	Relevante Beispiele
SNVs und Indels	<i>EGFR, POLE, TMRSS2, BRAF</i>
Genfusionen	<i>ALK, ROS1, NTRK, RET</i>
CNVs	<i>HER2</i>
MSI	MSI-Score
TMB	TMB-Score

Eine vollständige Genliste finden Sie unter [illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html](https://illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html)

### Bewährte Technologie für die Bestimmung seltener Biomarker

Mithilfe bewährter SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) von Illumina ermöglicht TruSight Oncology 500 ctDNA das umfassende genomische Profiling anhand von nur 30 ng cfDNA. Damit stellt die Lösung eine ideale Alternative dar, wenn Gewebe nicht ohne Weiteres verfügbar ist, oder kann ergänzend zur Gewebebiopsie eingesetzt werden. Die Bibliotheksvorbereitung profitiert von der Target-Anreicherung, bei der aus DNA-basierten Bibliotheken ausgewählte Targets mithilfe biotinylierter Sonden und streptavidinbeschichteter magnetischer Beads angereichert werden. Die Capture-Anreicherung erlaubt eine zielgerichtete Hybridisierung durch eine hohe Bindungsspezifität der verwendeten Sonden, die eine Hybridisierung an Targets mit kleineren Mutationen spezifisch möglich machen. Dieser Ansatz verringert den Verlust von Proben, wenn natürliche Allelvarianten oder Sequenzierungsartefakte vorhanden sind.



Abbildung 2: TruSight Oncology 500 ctDNA-Assay-Workflow: Der TruSight Oncology 500 ctDNA-Assay lässt sich in derzeitige Labor-Workflows integrieren. Von der cfDNA bis zum Variantenbericht sind fünf Tage erforderlich. Die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software kann lokal auf einem DRAGEN Server oder in der Cloud über Illumina Connected Analytics ausgeführt werden.

Da ctDNA nur einen kleinen Anteil der cfDNA darstellt, sind leistungsstarke Methoden erforderlich, um Signal und Rauschen zu unterscheiden. Die Bibliotheksvorbereitung beinhaltet außerdem eindeutige molekulare Identifikatoren (UMIs, Unique Molecular Identifiers), die die Identifizierung extrem seltener Varianten ermöglichen.<sup>4</sup> TruSight Oncology 500 ctDNA-Bibliotheken werden auf dem NovaSeq 6000 System bei einer hohen Tiefe (400 Mio Reads je Probe bei ca. 35.000-fach) sequenziert, um die Sensitivität zu erhöhen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, Mutationen bei einer Variantenallelfrequenz (VAF) für kleine Varianten von 0,5 % mit einer analytischen Sensitivität von 95 % und einer analytischen Spezifität von > 99,995 % zu bestimmen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Hochpräzise Bestimmung seltener Varianten

Variantentyp	Analytische Sensitivität <sup>a</sup>	Analytische Spezifität <sup>b</sup>
Kleine Varianten (≥ 0,5 % VAF)	≥ 95 %	≥ 99,995 %
Genamplifikationen (Fold-Change ≥ 1,4)	≥ 95 %	≥ 95 %
Gendeletionen (Fold-Change ≤ 0,6)	≥ 95 %	≥ 95 %
Genfusionen (0,5 %)	≥ 95 %	≥ 95 %
MSI-high-Nachweis (≥ bei 2 % Tumorfraction)	≥ 95 %	≥ 95 %

a. Die analytische Sensitivität ist die Erkennungsrate in Prozent beim angegebenen Variantengrad.  
 b. Die analytische Spezifität ist die Fähigkeit zur Erkennung eines bekannten negativen Ergebnisses.

## Genauere, schnellere Analyse

Die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software verwendet beschleunigte und vollständig integrierte Bioinformatikalgorithmen, die eine optimale Assay-Leistung sicherstellen. Die Software führt das Sequenz-Alignment sowie die Fehlerkorrektur durch Collapsing der Sequenz und anschließend das Varianten-Calling auf Basis der Rohdaten durch. Doppelte Reads sowie Sequenzierungsfehler werden ohne Signalverlust für seltene Varianten entfernt, was Varianten-Calling-Ergebnisse mit hoher Sensitivität gewährleistet. Alle Pipeline-Komponenten befinden sich innerhalb der DRAGEN-Plattform, was zusätzliche Leistungsverbesserungen und Effizienz bedeutet.

Im Gegensatz zu qualitativen Ergebnissen aus PCR-basierten Assays bietet die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software einen quantitativen MSI-Score, der anhand von über 2.400 Homopolymer-MSI-Markerloci ermittelt wird.

Für die TMB-Analyse optimiert die DRAGEN-Software die Sensitivität, indem sowohl nicht synonyme als auch synonyme SNVs und Indels gemessen werden. Im Anschluss an Varianten-Calling und Fehlerkorrektur wird die Genauigkeit der TMB-Messung weiter erhöht, indem nach Keimbahnvarianten, Varianten mit geringer Konfidenz und Varianten gefiltert wird, die in Zusammenhang mit klonaler Hämatopoese unbestimmten Potenzials stehen.

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software wird lokal auf einem Illumina DRAGEN Server der Version 3 oder 4 bzw. in der Cloud über Illumina Connected Analytics (ICA) ausgeführt. Die ultraschnelle Plattform bietet erweiterte Hardware und Software, die die Dauer der Datenanalyse um ca. 85 % von neun Tagen auf ca. 20 Stunden verkürzen (Abbildung 3). Mit ICA erhalten Labore eine sichere Cloudplattform für Genomikanwendungen, auf der sie umfangreichere Sekundäranalysen durchführen können, ohne dass sie dafür zusätzliche lokale Infrastruktur erwerben und unterhalten müssen.<sup>5</sup> Zusätzlich ist die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software mit der DRAGEN v3.10-Software kompatibel. Hierbei handelt es sich um dieselbe Version, die beim TruSight Oncology 500-Assay für die Analyse von Gewebe solider Tumoren zum Einsatz kommt. Diese gemeinsame Verwendung der Plattform ermöglicht Laboren zusätzliche Flexibilität.

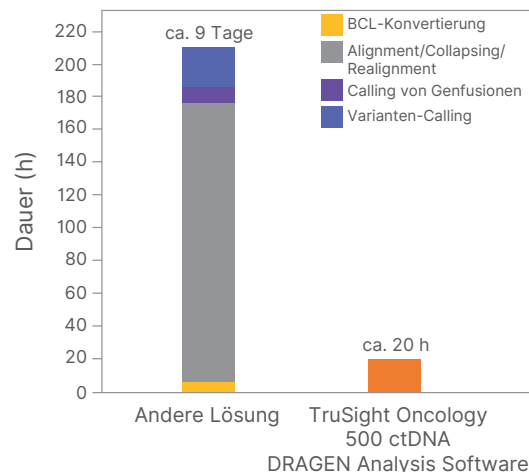


Abbildung 3: Der lokale DRAGEN Server v4 beschleunigt die Datenanalyse: Die TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis Software vereint unterschiedliche Datenanalyseschritte in einem einzigen, ca. 20-stündigen Prozess. Das ist eine Zeitersparnis von ca. 85 % im Vergleich zu anderen Lösungen. Der Vergleich der Analysedauer bezieht sich auf die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1-Pipeline auf einem DRAGEN v4-Server für 24 Proben mit einer S4-Fließzelle sowie eine andere Lösung mit Einzelknoten (128 GB Speicher, CPU mit 24 Kernen), bei der eine nicht parallel ausgeführte Pipeline für 24 Proben mit einer S4-Fließzelle zum Einsatz kommt.

Pierian Clinical Genomics Workspace vervollständigt den Workflow mit der Tertiäranalyse. Laden Sie einfach die Variantenberichtsdateien aus einer lokalen oder ICA-basierten Sekundäranalyseumgebung in die Clinical Genomics Workspace-Cloud hoch. Clinical Genomics Workspace führt die Variantenannotation und -filterung durch und ermöglicht so eine problemlose Interpretation und Berichterstellung. Clinical Genomics Workspace filtert und priorisiert aus Tausenden Varianten im Genom die biologisch relevanten Varianten für den abschließenden, automatisch generierten und anpassbaren Genomikbericht. Der gesamte Workflow, von der cfDNA bis hin zu konsolidierten Variantenberichten, nimmt lediglich fünf Tage in Anspruch (Abbildung 2).

### Umfassende Validierung für genaue und hochgradig reproduzierbare Ergebnisse

Zur Verdeutlichung der hohen Qualität der mit TruSight Oncology 500 ctDNA erzielten Ergebnisse hat Illumina zahlreiche Studien zur Calling-Fähigkeit bei SNVs, CNVs, Genfusionen, TMB und MSI durchgeführt (Abbildungen 4 und 5, Tabellen 5 und 6).

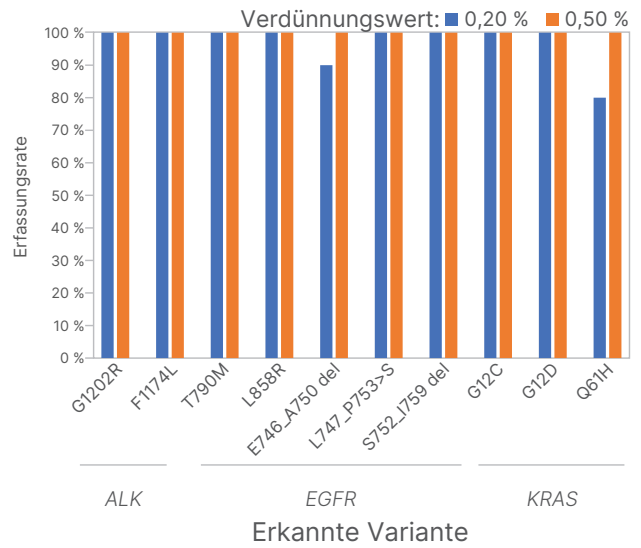


Abbildung 4: Erkennung kleiner Varianten mit geringer VAF: Proben mit bekannter VAF für jede Variante wurden auf Werte zwischen 0,10 und 1,00 % VAF verdünnt. Fünf Replikate für jede Probe wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA unter Verwendung von 30 ng kommerzieller Referenzkontroll-DNA analysiert.

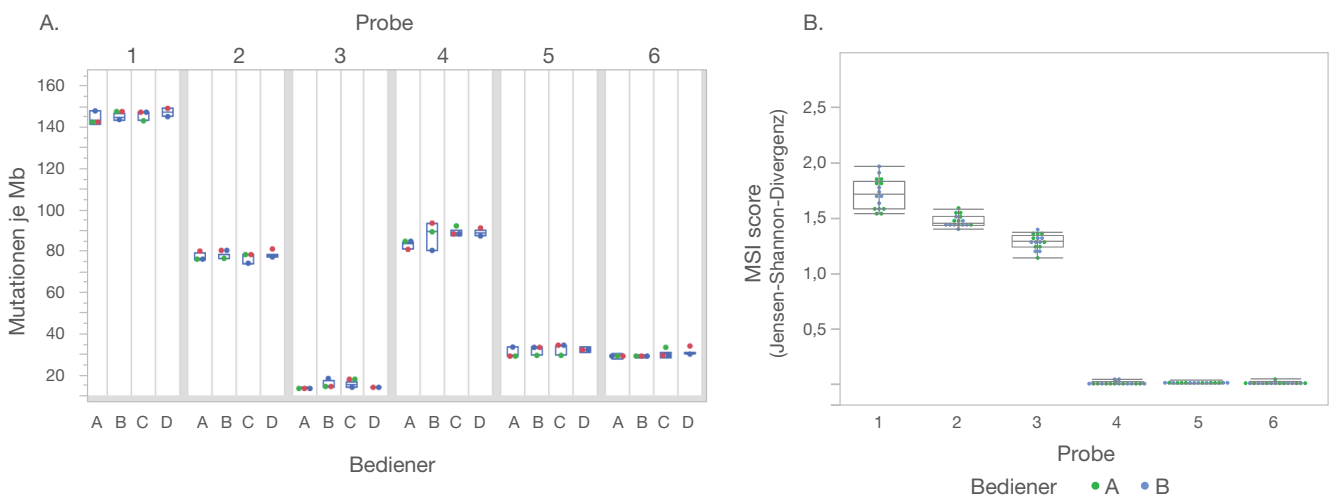


Abbildung 5: Reproduzierbare TMB- und MSI-Messung: (A) TMB wurde in sechs unterschiedlichen Plasmaproben (1–6) bei vier Anwendern (A, B, C, D) dreifach ausgewertet (grüne, blaue und rote Punkte). (B) MSI wurde in drei nukleosomal vorbereiteten Zelllinien mit bekanntem MSI-high-Status (Proben 1–3) und drei cfDNA-Proben aus MSI-high-Tumoren mit geringer Prävalenz (Proben 4–6) bei zwei verschiedenen Anwendern (A – grün, B – blau) evaluiert.

Tabelle 5: Sensitive Erkennung von CNVs

Gen	Erwarteter Fold-Change	Gemessener Mittelwert	Standard-abweichung	Erfassungsrate
<b>Amplifikationen</b>				
<i>BRCA2</i>	1,8	1,4	0,01	100 %
<i>CCND3</i>	1,5	1,3	0,01	100 %
<i>FGF14</i>	1,3	1,5	0,01	100 %
<i>FGF3</i>	1,6	1,4	0,01	100 %
<i>FGF4</i>	1,7	1,4	0,01	100 %
<i>FGFR2</i>	1,6	1,4	0,01	100 %
<i>MET</i>	1,5	1,3	0,01	100 %
<i>MYC</i>	1,9	1,7	0,02	100 %
<b>Deletionen</b>				
<i>BRCA1</i>	0,7	0,7	0	100 %
<i>BRCA2</i>	0,6	0,6	0,01	100 %

Proben mit bekannten Fold-Change-Werten für Genamplifikationen und Deletionen wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA mit 30 ng cfDNA-Zugabe analysiert. Es wurden fünf Replikate jeder Probe analysiert.

Tabelle 6: Erkennung von Genfusionen bei niedriger VAF

Genfusion	Erwartete VAF	Gemessene VAF	Standard-abweichung	Erfassungsrate
<i>FGFR2-COL14A1</i>	4,1 %	4,1 %	0,5 %	100 %
<i>NPM1-ALK</i>	3,4 %	0,6 %	0,1 %	100 %
<i>FGFR3-BAIAP2L1</i>	3,4 %	0,8 %	0,2 %	100 %
<i>NPM1-ALK</i>	2,4 %	0,6 %	0,1 %	100 %
<i>EML4-ALK</i>	1,7 %	0,5 %	0,1 %	100 %
<i>CCDC6-RET</i>	1,0 %	0,7 %	0,1 %	100 %
<i>FGFR2-COL14A1</i>	0,9 %	0,4 %	0,2 %	100 %
<i>EML4-ALK</i>	0,7 %	0,2 %	0,1 %	100 %
<i>EML4-ALK</i>	0,5 %	0,5 %	0,3 %	100 %
<i>NPM1-ALK</i>	0,5 %	0,2 %	0,0 %	100 %
<i>NCOA4-RET</i>	0,5 %	0,2 %	0,0 %	100 %
<i>CCDC6-RET</i>	0,2 %	0,1 %	0,1 %	100 %

Es wurden Proben mit bekannten Genfusions-Allelhäufigkeiten zwischen ca. 0,5 und 4 % untersucht. Fünf Replikate für jede Probe wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA unter Verwendung von 30 ng cfDNA analysiert. Richtung der Genfusionen auf Grundlage bekannter Expression. Weitere Informationen zur DNA-basierten Fusionsrichtung finden Sie im [Benutzerhandbuch zur TruSight Oncology 500 ctDNA Local App](#).

## Zusammenfassung

TruSight Oncology 500 ctDNA ist ein NGS-basierter Multiplex-Assay für die Forschung, der Hunderte krebisrelevanter, aus Plasma extrahierter Biomarker gleichzeitig analysiert. Der Assay-Inhalt entspricht aktuellen Richtlinien sowie klinischen Studien. Der einzelne, umfassende Assay erkennt zahlreiche Variantentypen bei 523 Genen, die verschiedene Tumorarten abdecken, ohne dass mehrere Proben für wiederholte Tests erforderlich sind. TruSight Oncology 500 ctDNA ermöglicht außerdem die Auswertung von Immunonkologie- und neuen Biomarkern (TMB, MSI, *NTRK* und *ROS1*). Mit umfassendem Geninhalt, branchenführender Sequenzierungstechnologie und hochentwickelter Software bietet TruSight Oncology 500 ctDNA eine Komplettlösung, die dank einfacher Anwendung und Analyse die schnellere Durchführung von Projekten in der klinischen Forschung ermöglicht.

## Weitere Informationen

TruSight Oncology 500 ctDNA: [illumina.com/tso500-ctDNA](https://illumina.com/tso500-ctDNA)

NovaSeq 6000 System: [illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html](https://illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html)

DRAGEN Bio-IT Platform: [illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-bio-it-platform.html](https://illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-bio-it-platform.html)

Illumina Connected Analytics: [illumina.com/products/by-type/informatics-products/connected-analytics.html](https://illumina.com/products/by-type/informatics-products/connected-analytics.html)

## Quellen

1. Illumina. Enhanced sequencing capabilities with the NovaSeq 6000 v1.5 Reagent Kit. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/)

## Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit (48 samples, 16 indexes)	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus Pierian Interpretation Report (48 samples, 16 indexes)	20043410
<b>Sequenzierungsreagenzien-Kits</b>	
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028312
NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	20043131
<b>Lokale Variantenberichte</b>	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan	20032797
Illumina DRAGEN Server Installation	20031995
<b>Cloud-Variantenberichte</b>	
ICA Basic Annual Subscription	20044874
ICA Professional Annual Subscription	20044876
ICA Enterprise Annual Subscription	20038994
ICA Enterprise Compliance Add-on (applies to Basic only)	20066830
ICA Training and Onboarding	20049422
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 1 credit	20042038
ICA Data Storage: Illumina Analytics Starter Pack, 1000 credits	20042039
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 5000 credits	20042040
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 50,000 credits	20042041
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 100,000 credits	20042042



- [novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013/novaseq-v1.5-reagents-tech-note-770-2020-013.pdf](#). Veröffentlicht 2020. Aufgerufen am 30. März 2022.
2. 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. doi:10.1038/s41591-019-0561-9
  3. 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. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0624
  4. Illumina. TruSight Oncology UMI Reagents. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf](#). Veröffentlicht 2017. Aufgerufen am 15. März 2022.
  5. Illumina. Illumina Connected Analytics Security Brief. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/ica-security-brief-m-gl-00683/ica-security-brief-m-gl-00683.pdf](#). Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 16. März 2022.



+1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) | +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA)  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 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-00843 DEU v4.0