

# TruSight™ Tumor 170

Un saggio completo di sequenziamento di nuova generazione che mira alle varianti del DNA e dell'RNA dallo stesso campione di tumore fissato in formalina e incluso in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

## Punti principali

- **Copertura completa delle varianti relative al cancro**  
Efficienza in un singolo saggio utilizzando DNA e RNA per la valutazione di varianti piccole, amplificazioni, varianti di splicing e fusioni
- **Flusso di lavoro ottimizzato e integrato**  
Le librerie di DNA e RNA sono preparate in parallelo mediante un flusso di lavoro integrato seguendo la frammentazione (shearing) del DNA/sintesi di cDNA
- **Risultati accurati da campioni di bassa qualità**  
Rilevamento della variante da input di 40 ng di DNA/RNA e con appena il 5% della frequenza dell'allele mutante da campioni in FFPE

## Introduzione

Il cancro rappresenta una delle principali cause di decesso in tutto il mondo e ha il potenziale di originarsi in qualsiasi tessuto.<sup>1</sup> L'analisi delle basi genetiche di un determinato tumore è importante per capirne la progressione e per sviluppare nuovi metodi di trattamento. Tuttavia, diversi geni possono causare o incidere sulla progressione del tumore e molti tumori eterogenei presentano più mutazioni. Inoltre, la funzione di qualsiasi gene può essere alterata da diversi tipi di variazioni incluse varianti di singolo nucleotide (Single-Nucleotide Variant, SNV), varianti di multipli nucleotidi (Multiple-Nucleotide Variant, MNV), inserzioni o delezioni (Indel) piccole, amplificazioni, variazioni di splicing e fusioni del gene. Risulta quindi difficile per i ricercatori analizzare i tumori in modo efficiente, in quanto i metodi disponibili coprono solo una porzione di queste variazioni e l'analisi sequenziale fa perdere tessuto, tempo e risorse.

Per aiutare i ricercatori ad affrontare questa sfida, Illumina offre TruSight Tumor 170, un saggio di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) progettato per

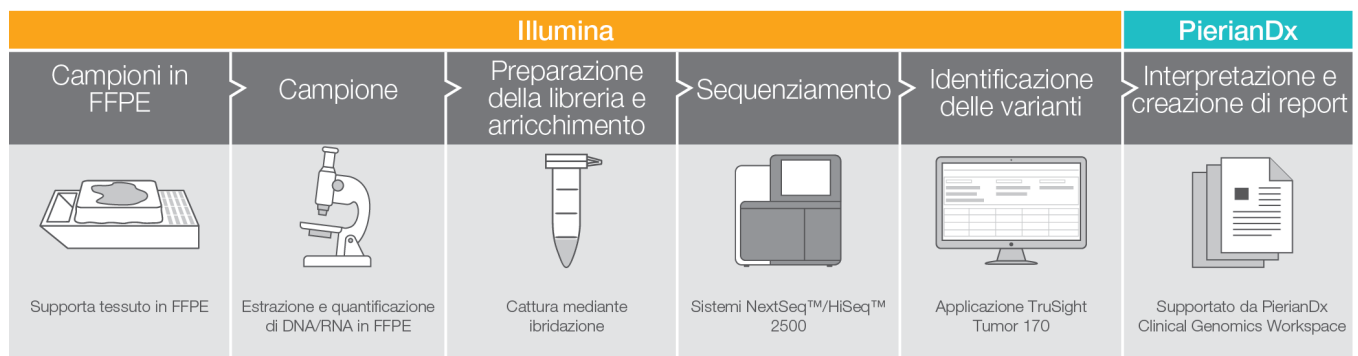
coprire 170 geni associati con i tumori solidi. TruSight Tumor 170 è un pannello mirato basato sull'arricchimento che analizza contemporaneamente il DNA e l'RNA, coprendo un'ampia gamma di geni e tipi di varianti. Il pannello è progettato per essere utilizzato con i sistemi di sequenziamento NextSeq™ 500, NextSeq 550 o HiSeq™ 2500 (Figura 1).

## Progettazione completa del contenuto relativo al cancro

TruSight Tumor 170 mira a tutti gli esoni codificanti, in base all'attuale database RefSeq,<sup>2</sup> in 170 geni (Tabella 1). L'analisi dei geni e l'analisi dei tipi di varianti per ciascun gene sono state attentamente selezionate in modo da includere il contenuto citato da organizzazioni professionali quali il National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e la European Society for Medical Oncology (ESMO).<sup>3,4</sup> Alla progettazione di TruSight Tumor 170 hanno contribuito anche le pubblicazioni indipendenti dei consorzi e le ricerche farmaceutiche più recenti. Il contenuto include 55 geni per fusioni e varianti di splicing, 148 SNV e Indel e 59 amplificazioni. Sfruttando le competenze di organizzazioni affermate nella comunità oncologica, TruSight Tumor 170 fornisce ai ricercatori la copertura completa delle varianti che più probabilmente giocano un ruolo importante nell'oncogenesi.

## Flusso di lavoro combinato per DNA e RNA

La preparazione delle librerie per TruSight Tumor 170 prevede l'uso di un metodo di arricchimento che può essere applicato contemporaneamente al DNA e all'RNA estratto dallo stesso campione. Dopo le fasi iniziali, nelle quali il DNA genomico viene sottoposto a frammentazione (shearing) e l'RNA viene convertito in cDNA, la preparazione delle librerie diventa un flusso di lavoro combinato (Figura 2).



**Figura 1: Flusso di lavoro di TruSight Tumor 170:** TruSight Tumor 170 è ottimizzato per l'integrazione negli attuali flussi di lavoro del laboratorio e per passare dagli acidi nucleici all'identificazione delle varianti in meno di quattro giorni. Il saggio può essere analizzato sulla serie NextSeq o sul sistema HiSeq 2500.

Tabella 1: Contenuto del gene nel saggio TruSight Tumor 170

SNV e Indel (da DNA)									
AKT1	BRIP1	CREBBP	FANCI	FGFR2	JAK3	MSH3	PALB2	RAD51D	TSC1
AKT2	BTK	CSF1R	FANCL	FGFR3	KDR	MSH6	PDGFRA	RAD54L	TSC2
AKT3	CARD11	CTNNB1	FBXW7	FGFR4	KIT	MTOR	PDGFRB	RB1	VHL
ALK	CCND1	DDR2	FGF1	FLT1	KMT2A (MLL)	MUTYH	PIK3CA	RET	XRCC2
APC	CCND2	DNMT3A	FGF2	FLT3	KRAS	MYC	PIK3CB	RICTOR	
AR	CCNE1	EGFR	FGF3	FOXL2	MAP2K1	MYCL1	PIK3CD	ROS1	
ARID1A	CD79A	EP300	FGF4	GEN1	MAP2K2	MYCN	PIK3CG	RPS6KB1	
ATM	CD79B	ERBB2	FGF5	GNA11	MCL1	MYD88	PIK3R1	SLX4	
ATR	CDH1	ERBB3	FGF6	GNAQ	MDM2	NBN	PMS2	SMAD4	
BAP1	CDK12	ERBB4	FGF7	GNAS	MDM4	NF1	PPP2R2A	SMARCB1	
BARD1	CDK4	ERCC1	FGF8	HNF1A	MET	NOTCH1	PTCH1	SMO	
BCL2	CDK6	ERCC2	FGF9	HRAS	MLH1	NOTCH2	PTEN	SRC	
BCL6	CDKN2A	ERG	FGF10	IDH1	MLL3	NOTCH3	PTPN11	STK11	
BRAF	CEBPA	ESR1	FGF14	IDH2	MPL	NPM1	RAD51	TERT	
BRCA1	CHEK1	EZH2	FGF23	INPP4B	MRE11A	NRAS	RAD51B	TET2	
BRCA2	CHEK2	FAM175A	FGFR1	JAK2	MSH2	NRG1	RAD51C	TP53	
Amplificazioni (da DNA)									
AKT2	BRCA2	CHEK1	ERCC2	FGF5	FGF14	FGFR4	MDM4	NRG1	RAF1
ALK	CCND1	CHEK2	ESR1	FGF6	FGF19	JAK2	MET	PDGFRA	RET
AR	CCND3	EGFR	FGF1	FGF7	FGF23	KIT	MYC	PDGFRB	RICTOR
ATM	CCNE1	ERBB2	FGF2	FGF8	FGFR1	KRAS	MYCL1	PIK3CA	RPS6KB1
BRAF	CDK4	ERBB3	FGF3	FGF9	FGFR2	LAMP1	MYCN	PIK3CB	TFRC
BRCA1	CDK6	ERCC1	FGF4	FGF10	FGFR3	MDM2	NRAS	PTEN	
Fusioni e varianti di splicing (da RNA)									
ABL1	BRAF	EML4	ETV4	FGFR4	KIF5B	MYC	NTRK2	PIK3CA	TMPRSS2
AKT3	BRCA1	ERBB2	ETV5	FLI1	KIT	NOTCH1	NTRK3	PPARG	
ALK	BRCA2	ERG	EWSR1	FLT1	KMT2A (MLL)	NOTCH2	PAX3	RAF1	
AR	CDK4	ESR1	FGFR1	FLT3	MET	NOTCH3	PAX7	RET	
AXL	CSF1R	ETS1	FGFR2	JAK2	MLL3	NRG1	PDGFRA	ROS1	
BCL2	EGFR	ETV1	FGFR3	KDR	MSH2	NTRK1	PDGFRB	RPS6KB1	

- Il DNA e il cDNA sottoposti a frammentazione (shearing) vengono convertiti in librerie sequenziabili.
- Le regioni di interesse vengono ibridate su sonde marcate con biotina, catturate mediante magneti che attirano le microsferie coniugate con streptavidina ed eluite per arricchire il pool di librerie.
- Le librerie vengono normalizzate utilizzando un semplice protocollo basato su microsferie prima del raggruppamento in pool e il sequenziamento.

## Analisi dei dati di TruSight Tumor 170

I sistemi di sequenziamento Illumina consentono il collegamento a BaseSpace® Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico Illumina per l'analisi e la gestione dei dati del sequenziamento. Questo consente ai ricercatori di conservare, analizzare e archiviare nonché condividere i dati del sequenziamento in modo sicuro. L'applicazione TruSight Tumor 170 è progettata per eseguire l'identificazione delle varianti che permette la creazione di report a valle in un formato di facile lettura. Vengono forniti gli output di dati non elaborati per varianti piccole, amplificazioni, fusioni e varianti di splicing, nonché output mirati di facile utilizzo che garantiscono risultati altamente affidabili per varianti di RNA e fusioni.

L'applicazione TruSight Tumor 170 è disponibile in BaseSpace Sequence Hub. Per gli utenti che desiderano eseguire l'analisi secondaria nel laboratorio, Illumina offre per l'applicazione un'immagine basata su Docker. Per maggiori informazioni, rivolgetevi all'ufficio vendite o al rappresentante alle vendite o al supporto.

## Rilevamento delle varianti sensibile e di elevata sicurezza

Il sequenziamento profondo effettuato mediante la tecnologia NGS fornisce un'elevata sensibilità per rilevare la variazione somatica nelle sottopopolazioni del tumore. La chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina è la tecnologia NGS più ampiamente adottata che fornisce più del 90% dei dati complessivi del sequenziamento.\* Abbinato al sequenziamento di elevata qualità sui sistemi NextSeq e HiSeq, TruSight Tumor 170 è in grado di fornire una copertura uniforme delle regioni target, identificando le mutazioni somatiche ad appena il 5% della frequenza dell'allele mutante con una copertura minima di  $\geq 250\times$  (Tabella 2).

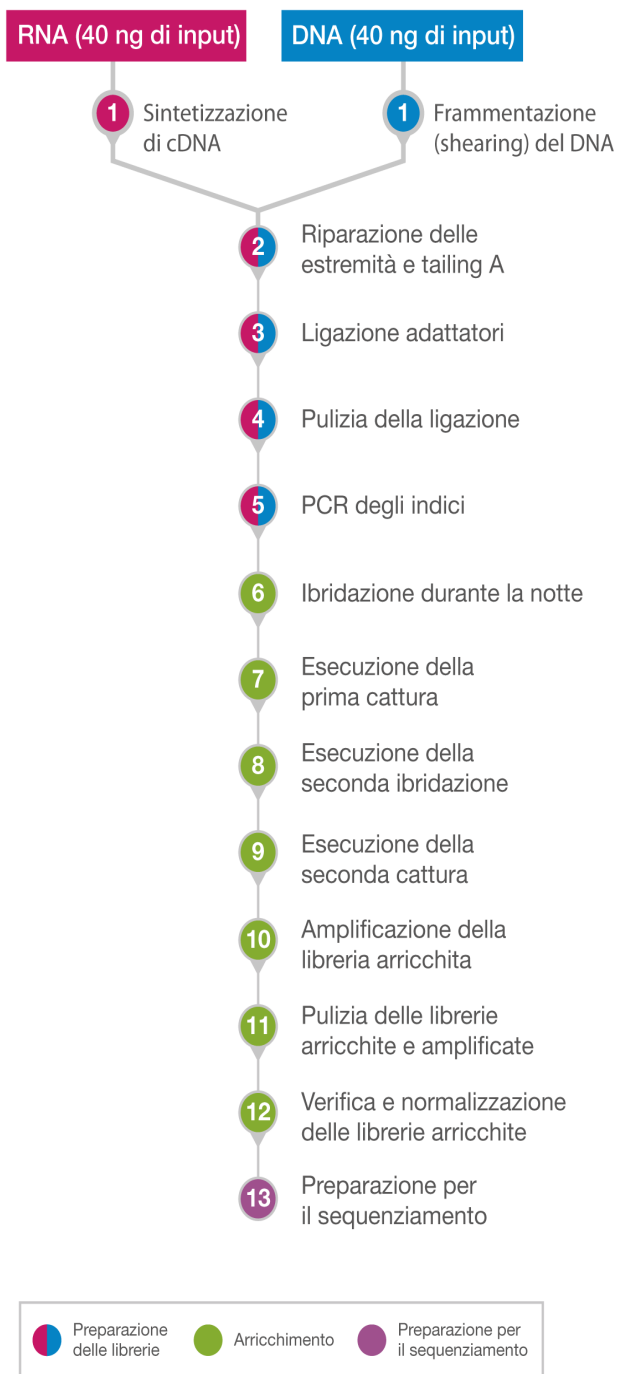


Figura 2: Flusso di lavoro di preparazione delle librerie combinato: i campioni di DNA e RNA seguono lo stesso flusso di lavoro, dopo la fase di sintesi del cDNA (per l'RNA) e dopo la fase di frammentazione (shearing) (per il DNA).

Tabella 2: Specifiche

Parametro	Dettagli
Sistema	Sistema NextSeq o HiSeq 2500
Dimensione del pannello	533 kb di DNA 358 kb di DNA
Dimensione minima inserto	79 bp di DNA 63 bp di DNA
Requisito di input di DNA	40 ng totale
Requisito di input di RNA	40 ng totale
Durata della preparazione delle librerie	32 ore
Durata della corsa di sequenziamento	24 ore (sistemi NextSeq) oppure 27 ore (sistema HiSeq 2500)
Corsa di sequenziamento	2 x 101 cicli
Dimensione del kit	24 campioni (sia DNA che RNA)
Rendimento dei campioni	8 campioni per corsa (sistemi NextSeq) oppure 6 campioni per la corsa Rapid Run (Corsa rapida) (sistema HiSeq 2500)
Sensibilità	5% della frequenza dell'allele mutante Più del 95% di sensibilità e specificità

### Copertura elevata di target da campioni di bassa qualità

Gli acidi nucleici estratti da tessuti in FFPE possono potenzialmente non superare le verifiche di controllo qualità e fornire una scarsa copertura target conferendo una bassa sensibilità analitica. TruSight Tumor 170 affronta questo problema generando librerie da acidi nucleici composti da frammenti di piccole dimensioni, da appena 79 bp per il DNA e 63 bp per l'RNA. Questo permette di ottenere una copertura profonda dei campioni in FFPE, anche quando la qualità degli acidi nucleici estratti è bassa (Figura 3).

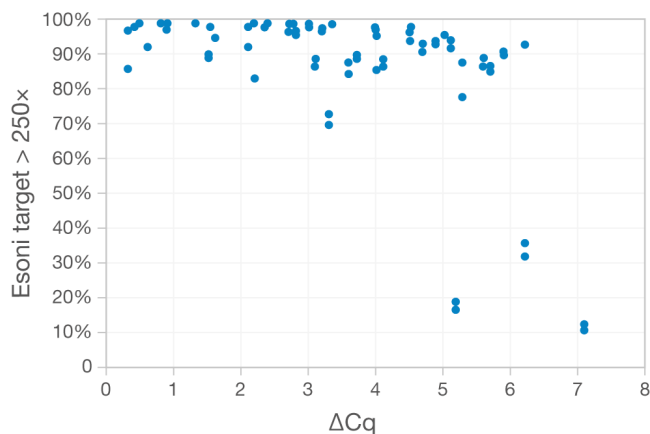


Figura 3: Copertura target da campioni in FFPE: il DNA estratto da campioni di tumore in FFPE di diversa qualità è stato valutato mediante il saggio TruSight Tumor 170 e sequenziato sul sistema NextSeq 500. È stata inoltre valutata la qualità di ciascun campione utilizzando qPCR per misurare la potenziale amplificazione del DNA. Il valore  $\Delta Cq$  indica il valore di soglia del ciclo (Cycle Threshold, Ct) di ciascun campione di DNA meno il valore Ct di un DNA standard.

\* Calcoli dei dati in archivio, Illumina, Inc., 2015.

## Rilevamento affidabile delle varianti piccole da campioni di qualità elevata o bassa

TruSight Tumor 170 fornisce sensibilità e accuratezza per l'identificazione delle variazioni a bassa frequenza in campioni di diverse qualità. La copertura elevata dei target permette l'identificazione sicura di varianti di livello basso in linee cellulari caratterizzate (Tabella 3). TruSight Tumor 170 permette il rilevamento di varianti in campioni di tumore in FFPE con appena il 5% della frequenza dell'allele mutante (Tabella 4).

**Tabella 3: Identificazione delle varianti piccole con linee cellulari caratterizzate**

Gene	Mutazione	Frequenza riportata	Frequenza rilevata	Copertura
APC	R2714C	0,33	0,31	2.547x
ARID1A	P1562fs	0,34	0,31	419x
BRAF	V600E	0,10	0,11	2.282x
BRCA2	A1689fs	0,33	0,30	1.097x
EGFR	G719S	0,24	0,22	2.207x
EP300	K291fs	0,08	0,06	1.359x
FBXW7	G667fs	0,34	0,30	2.870x
FGFR1	P150L	0,08	0,08	1.102x
FLT3	S985fs	0,10	0,10	1.925x
FLT3	V197A	0,12	0,10	1.908x
IDH1	S261L	0,10	0,09	2.052x
KIT	D816V	0,10	0,15	1.239x
KRAS	G13D	0,15	0,14	1.507x
KRAS	G12D	0,06	0,07	1.503x
MET	V237fs	0,06	0,06	3.700x
MLH1	L323M	0,08	0,09	1.725x
NF1	L626fs	0,08	0,10	1.270x
NOTCH1	P668S	0,32	0,32	1.637x
NRAS	Q61K	0,12	0,14	1.824x
PDGFRA	G426D	0,34	0,29	2.018x
PI3KCA	E545K	0,09	0,16	773x
PI3KCA	H1047R	0,18	0,15	1.694x

Il DNA dalla linea cellulare fissata in formalina HD200 (Horizon Diagnostics) contenente le varianti note è stato valutato utilizzando il saggio TruSight Tumor 170 e sequenziato sul sistema NextSeq 500. È stata osservata una concordanza del 100% con la frequenza prevista da tutte le varianti HD200.

**Tabella 4: Rilevamento di varianti piccole in campioni di tumore in FFPE**

Campione	Mutazione riportata	Mutazione rilevata	Frequenza rilevata	Copertura
FFPE_Colon	TP53 R158C	TP53 R158C	0,057	1.545x
FFPE_Ossa	TP53 P72R	TP53 P72R	0,059	515x
FFPE_Cervello1	PIK3CA E545G	PIK3CA E545G	0,078	289x
FFPE_Cervello2	PIK3CA H1047R	PIK3CA H1047R	0,076	531x
FFPE_Seno	KRAS G12D	KRAS G12D	0,049	1.671x
FFPE_Polmone1	KRAS G12D	KRAS G12D	0,059	575x
FFPE_Polmone2	TP53 C242F	TP53 C242F	0,080	691x
FFPE_Cute	TP53 R248Q	TP53 R248Q	0,050	1.240x

Il DNA ottenuto da campioni di tumore in FFPE è stato estratto e valutato utilizzando il saggio TruSight Tumor 170 e sequenziato sul sistema NextSeq 500. Tutti gli otto campioni in FFPE presentano una concordanza del 100% con le mutazioni riportate.

Tabella 5: Rilevamento di amplificazioni in campioni di tumore in FFPE

Campione	Amplificazione riportata	Livello di amplificazione riportata	Amplificazione rilevata	Livello di amplificazione rilevata
FFPE_Ossa	<i>FGF19</i>	1,4	<i>FGF19</i>	2,9
FFPE_Cervello2	<i>PDGFRA</i>	2,3	<i>PDGFRA</i>	2,9
FFPE_Seno	<i>RPS6KB1</i>	2,4	<i>RPS6KB1</i>	2,4
FFPE_Colon	<i>BRCA2</i>	2,2	<i>BRCA2</i>	2,0
FFPE_Polmone1	<i>PIK3CA</i>	2,4	<i>PIK3CA</i>	2,7
FFPE_Polmone2	<i>FGFR1</i>	2,4	<i>FGFR1</i>	2,9
FFPE_Polmone3	<i>MYC</i>	2,2	<i>MYC</i>	2,8
FFPE_Polmone4	<i>CCNE1</i>	2,1	<i>CCNE1</i>	2,2
FFPE_Polmone5	<i>EGFR</i>	2,2	<i>EGFR</i>	4,5
FFPE_Polmone6	<i>CCND1</i>	2,3	<i>CCND1</i>	2,9
FFPE_Stomaco1	<i>CDK6</i>	2,3	<i>CDK6</i>	1,7
FFPE_Stomaco2	<i>MET</i>	1,5	<i>MET</i>	1,4

Il DNA ottenuto da campioni di tumore in FFPE è stato estratto e quindi valutato utilizzando il saggio TruSight Tumor 170 e sequenziato sul sistema NextSeq 500. Tutti i dodici campioni in FFPE hanno mostrato il 100% di concordanza delle varianti.

## Identificazione affidabile di amplificazioni, fusioni e varianti di splicing da campioni in FFPE

TruSight Tumor 170 unisce la sensibilità dei sistemi di sequenziamento Illumina con le nuove piattaforme software per consentire l'identificazione simultanea di amplificazioni, fusioni e varianti di splicing. L'applicazione TruSight Tumor 170 dispone di nuovi algoritmi per l'identificazione delle varianti che forniscono identificazioni accurate di varianti di splicing, fusioni e amplificazioni dei geni da dati di sequenziamento non elaborati in campioni di diverse qualità (Tabelle 5 e 6).

## Riepilogo

TruSight Tumor 170 offre una soluzione di flusso di lavoro integrata per il rilevamento delle varianti somatiche comuni individuate nei tumori solidi. Le librerie di DNA e di RNA vengono preparate, sequenziate e analizzate contemporaneamente per permettere la valutazione efficiente di numerosi tipi di varianti somatiche. Sviluppato sulle linee guida basate sulle prove, con input da opinion leader chiave e dalla ricerca farmaceutica più recente, il pannello fornisce ai laboratori una visualizzazione completa dei geni rilevanti per il cancro e l'analisi accurata di varianti di bassa frequenza da DNA e RNA in FFPE. Tramite la valutazione di 170 geni e diversi tipi di varianti in un singolo saggio, TruSight Tumor 170 offre una panoramica genetica completa sui campioni di tumore in una soluzione ottimizzata.

Tabella 6: Identificazione delle fusioni e delle varianti di splicing in campioni in FFPE e linee cellulari

Campione	DV200	Variante riportata	Variante rilevata
FFPE_Tessuto cerebrale	N/A	Variante di splicing EGFR VIII	Variante di splicing EGFR VIII
FFPE_Tessuto mammario	81	Fusioni RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1	Fusioni RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1
FFPE_Tessuto del sarcoma di Ewing	48,9	Fusione EWSR1-FLI1	Fusione EWSR1-FLI1
FFPE_Linea cellulare gastrica	93	MET esone 14 salta (skipping) la variante di splicing	MET esone 14 salta (skipping) la variante di splicing
FFPE_Linea cellulare polmone	93	Fusione CCDC6-RET	Fusione CCDC6-RET
FFPE_Tessuto polmone1	73,3	Fusione EML4-ALK	Fusione EML4-ALK
FFPE_Tessuto polmone2	95	Fusioni FGFR3-TACC3	Fusioni FGFR3-TACC3
FFPE_Linea cellulare prostata	95,5	Variante di splicing ARV7	Variante di splicing ARV7
FFPE_Tessuto prostata	28,7	Fusioni TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT	Fusioni TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT

L'RNA ottenuto da campioni di tumore in FFPE è stato estratto e quindi valutato utilizzando il saggio TruSight Tumor 170 e sequenziato sul sistema NextSeq 500. Tutti i nove campioni in FFPE hanno mostrato il 100% di concordanza delle varianti. Il valore DV200 è utilizzato per valutare la qualità dell'RNA usato per preparare le librerie di sequenziamento e rappresenta la percentuale di frammenti di RNA che superano i 200 nucleotidi.

## Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su TruSight Tumor 170, visitate la pagina Web [www.illumina.com/TruSightTumor170](http://www.illumina.com/TruSightTumor170)

## Bibliografia

1. American Cancer Society. [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Consultato il 17 ottobre 2017.
2. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. [Reference sequence \(RefSeq\) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation](#). *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
3. National Comprehensive Cancer Network. [www.nccn.org](http://www.nccn.org). Consultato il 17 ottobre 2017.
4. European Society for Medical Oncology. [www.esmo.org](http://www.esmo.org). Consultato il 17 ottobre 2017.

## Informazioni per gli ordini

Kit per la preparazione delle librerie	N. di campioni	N. di catalogo
TruSight Tumor 170 Kit	24	OP-101-1004
TruSight Tumor 170 Kit, più PierianDx	24	20032628
TruSight Tumor 170 Kit, con reagenti NextSeq v2.5	24	20028821
TruSight Tumor 170 Kit, con reagenti NextSeq v2.5, più PierianDx	24	20032629

illumina, Inc. • Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) • Tel. +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2019 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, visitate la pagina Web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pubbl. n. 1170-2016-017-E-ITA QB5141

**Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.**

**illumina**<sup>®</sup>

1170-2016-017-E-ITA | 6