

# TruSight™ Oncology 500 ctDNA

Una mappatura genomica completa da campioni di biopsia liquida per scopi di ricerca sui tumori solidi

- Possibilità di sfruttare campioni di sangue minimamente invasivi come complemento alla biopsia dei tessuti o come alternativa quando il tessuto non è immediatamente disponibile
- Possibilità di analizzare i biomarcatori del DNA su oltre 500 geni, oltre a firme di immuno-oncologia come TMB e MSI
- Possibilità di ottenere bassi limiti di rilevamento con la preparazione di librerie a cattura ibrida basata su UMI e il sequenziamento profondo tramite il NovaSeq™ 6000 System
- Possibilità di passare dal cfDNA all'interpretazione del report in cinque giorni con una pipeline proprietaria di DRAGEN™ e diverse opzioni per l'analisi terziaria e il reporting

**illumina**®

## Introduzione

La biopsia liquida consente un'analisi esaustiva del DNA libero circolante (cfDNA, circulating cell-free DNA) nel plasma, fornendo un approccio non invasivo per la profilazione dei tumori solidi. Per sfruttare la biopsia liquida è fondamentale utilizzare un saggio altamente sensibile e specifico in grado di rilevare mutazioni somatiche a bassa frequenza. TruSight Oncology 500 ctDNA sfrutta la potenza della comprovata tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) di Illumina per ottenere questa elevata sensibilità analitica e ottenere una mappatura genomica completa del DNA tumorale circolante (ctDNA, circulating tumor DNA) presente nel cfDNA (Figura 1, Tabella 1). La combinazione di questa soluzione di ricerca avanzata con la potenza bioinformatica del DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software offre ai ricercatori clinici una soluzione dal DNA al report per la valutazione di più tipi di varianti in centinaia di geni in un unico saggio (Figura 2).

TruSight Oncology 500 ctDNA è compatibile con i reagenti per il sequenziamento NovaSeq 6000 v1.5. Oltre all'aumento dell'efficienza operativa che si traduce in una potenziale riduzione del prezzo per campione superiore al 35%, questi reagenti offrono una durata maggiore di sei mesi e punteggi Q30 migliori.<sup>1</sup>

## 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.

Gli studi dimostrano che l'analisi del cfDNA rileva un numero significativo di biomarcatori raccomandati dalle linee guida e di alterazioni della resistenza non riscontrate nelle corrispondenti biopsie dei tessuti.<sup>2</sup> Inoltre, uno studio sul carcinoma polmonare non a piccole cellule ha rivelato che le analisi del cfDNA sono altamente concordanti con le analisi basate sui tessuti.<sup>3</sup>

## Una base completa di contenuti

Il contenuto di TruSight Oncology 500 ctDNA è stato progettato collaborando con figure di riferimento riconosciute nella comunità oncologica. Include biomarcatori attuali ed emergenti con una copertura estesa dei geni coinvolti nelle linee guida chiave e nei trial clinici per diversi tipi di tumore. Il design della sonda del pannello cattura sia le fusioni geniche note sia quelle nuove e comprende 523 geni per rilevare le varianti probabilmente coinvolte nella tumorigenesi. I biomarcatori comprendono piccole varianti (SV, small variant), inserzioni/delezioni (indel), varianti di numero di copie (CNV, copy-number variant), fusioni geniche e firme genomiche immuno-oncologiche complesse, come l'instabilità microsatellitare (MSI, Microsatellite Instability) e il carico mutazionale del tumore (TMB, Tumor Mutational Burden) (Tabella 2).

 Per il contenuto del pannello, vedere l'elenco dei geni TruSight Oncology 500 ctDNA



Figura 1: La biopsia liquida consente la profilazione dei biomarcatori per diversi tipi di varianti e diversi tipi di tumore. Sostanziosi algoritmi di identificazione delle varianti e un'elevata profondità di sequenziamento consentono di rilevare biomarcatori chiave nel cfDNA con un limite di rilevamento (LOD, Limit of detection) dello 0,5%.

Tabella 1: TruSight Oncology 500 ctDNA in sintesi

Parametro	TruSight Oncology 500 ctDNA
Sistema	NovaSeq 6000 System
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 <sup>a</sup>
Tipo di campione	cfDNA derivato dal sangue
Durata totale del saggio	5 giorni dalla preparazione della libreria al report sulla variante
Durata della corsa di sequenziamento	Corsa: 36 h; analisi: 10 h (cella a flusso S2) Corsa: 45 h; analisi: 22 h (cella a flusso S4)
Corsa di sequenziamento	2 × 151 bp
Versione del software	DRAGEN TruSight Oncology ctDNA v2.1.1
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 le amplificazioni geniche 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 varianti)
Specificità analitica	≥95%

a. Si raccomanda la quantificazione con l'Agilent TapeStation System o il Fragment Analyzer System.

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

Per un elenco completo dei geni, consultare la pagina [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).

### Tecnologia collaudata per il rilevamento di biomarcatori a basso livello

Utilizzando la comprovata chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) di Illumina, TruSight Oncology 500 ctDNA consente di ottenere una mappatura genomica completa da soli 30 ng di cfDNA, rendendo questa tecnica un'alternativa ideale da utilizzare quando il tessuto non è immediatamente disponibile o come complemento all'analisi del tessuto. La preparazione delle librerie sfrutta l'arricchimento target, utilizzando sonde biotilate e microsferi magnetiche rivestite di streptavidina per arricchire i target selezionati dalle librerie basate sul DNA. L'arricchimento mirato per ibridazione o acquisizione utilizza sonde sufficientemente grandi da conferire un'elevata specificità di legame, pur consentendo l'ibridazione di target contenenti piccole mutazioni. Questo approccio riduce i dropout del campione in presenza sia di variazioni alleliche naturali sia di artefatti di sequenziamento.



Figura 2: Flusso di lavoro del saggio TruSight Oncology 500 ctDNA. Il saggio TruSight Oncology 500 ctDNA si integra nei flussi di lavoro del laboratorio già in essere, permettendo di ottenere un report sulle varianti partendo dal cfDNA in cinque giorni.

a. Il NovaSeq 6000Dx System in modalità RUO non è stato ampiamente testato, ma è considerato tecnicamente compatibile; richiede un server DRAGEN separato e indipendente se si desidera un'analisi secondaria locale.

b. Non disponibile in tutti i Paesi. Illumina Connected Insights supporta l'analisi terziaria definita dall'utente attraverso le identificazioni API a fonti di conoscenza di terze parti.

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, unique molecular identifier) che permettono l'identificazione di varianti a bassissima frequenza.<sup>4</sup> Le librerie di TruSight Oncology 500 ctDNA sono sequenziate sul NovaSeq 6000 System ad alta profondità (400 milioni di letture per campione a circa 35.000x) per aumentare la sensibilità. Il risultato è la capacità di rilevare mutazioni allo 0,5% di frequenza allelica delle varianti (VAF, Variant Allele Frequency) per le varianti piccole, con una sensibilità analitica del 95% e una specificità analitica superiore al 99,995% (Tabella 3).

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

Tipo di variante	Sensibilità analitica <sup>a</sup>	Specificità analitica <sup>b</sup>
Piccole varianti (≥0,5% VAF)	≥95%	≥99,995%
Amplificazioni geniche (variazione ≥1,4 volte)	≥95%	≥95%
Delezioni geniche (variazione ≤0,6 volte)	≥95%	≥95%
Fusioni geniche (0,5%)	≥95%	≥95%
Rilevamento MSI elevato (≥ al 2% di frazione tumorale)	≥95%	≥95%

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

## Analisi accurata e accelerata

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software utilizza algoritmi bioinformatici accelerati e completamente integrati per garantire prestazioni ottimali del saggio. Il software esegue l'allineamento delle sequenze, la correzione degli errori mediante il collasso della sequenza e l'identificazione delle varianti sulla base dei dati non elaborati. Le letture duplicate e gli errori di sequenziamento vengono rimossi senza perdere il segnale per le varianti a bassa frequenza e producendo risultati di identificazione delle varianti ad alta sensibilità. Tutti i componenti della pipeline sono all'interno della piattaforma DRAGEN, per migliorare ulteriormente le prestazioni e l'efficienza.

A differenza dei risultati qualitativi dei saggi basati su PCR, DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software fornisce un punteggio MSI quantitativo derivato da oltre 2.400 siti marker MSI omopolimerici.

Per l'analisi TMB, il software DRAGEN ottimizza la sensibilità misurando indel e SNV non sinonimi e sinonimi. Dopo l'identificazione delle varianti e la correzione degli errori, l'accuratezza della misurazione TMB viene ulteriormente migliorata filtrando le varianti della linea germinale, le varianti a bassa affidabilità e le varianti associate all'emopoiesi clonale a potenziale indeterminato.

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software viene eseguito localmente su un Illumina DRAGEN Server v3 o v4 oppure sul cloud tramite Illumina Connected Analytics. La piattaforma DRAGEN ultrarapida offre hardware e software avanzati che riducono i tempi di analisi dei dati dell'85%, ovvero da nove giorni a circa 20 ore (Figura 3). Grazie alla compatibilità con DRAGEN v3.10, gli utenti possono eseguire i saggi TruSight Oncology ctDNA e TruSight Oncology 500 sullo stesso server DRAGEN locale, fornendo una maggiore flessibilità. Connected Analytics offre una piattaforma genomica sicura, ottimizzata e basata sul cloud per scalare l'analisi secondaria senza la necessità di acquisire e mantenere un'infrastruttura più locale.<sup>5</sup> Per ridurre ulteriormente i punti di contatto manuali, Connected Analytics include lo streaming dei dati e le funzionalità di avvio automatico.

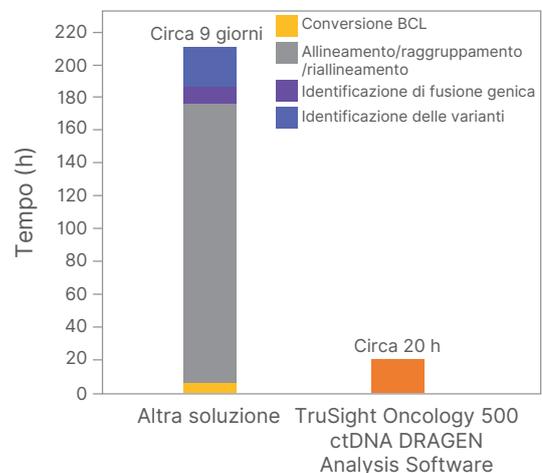


Figura 3: Il DRAGEN Server v4 in sede riduce i tempi di analisi. TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis Software consolida le varie fasi dell'analisi dei dati in un unico processo che richiede circa 20 ore, con una riduzione dell'85% rispetto ad altre soluzioni. Per i tempi di analisi indicati è stato fatto un confronto tra la pipeline DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1 su un DRAGEN Server v4 per 24 campioni che utilizzano una cella a flusso S4 e un'altra soluzione che utilizza una pipeline non parallelizzata a singolo nodo (128 G di memoria, CPU a 24 core) per l'analisi di 24 campioni che utilizzano una cella a flusso S4.

 Per ulteriori informazioni leggere la nota tecnica [Sicurezza, privacy e conformità con Illumina Connected Analytics](#).

Le informazioni sulle varianti e la generazione finale dei report sono disponibili tramite l'integrazione con Illumina Connected Insights e altri fornitori commerciali, tra cui Pierian Clinical Genomics Workspace. I file di identificazione delle varianti prodotti localmente o tramite cloud con Illumina Connected Analytics possono essere caricati nello strumento di analisi terziaria preferito. Da potenzialmente migliaia di varianti, le varianti biologicamente rilevanti possono essere filtrate e priorizzate in un report finale personalizzabile. L'intero flusso di lavoro, dal cfDNA alla creazione consolidata dei report relativi alle 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 eseguito diversi studi per valutare la capacità di identificazione delle SNV, delle CNV, delle fusioni geniche, del TMB e della MSI (Figura 4 e 5, Tabelle 5 e 6).

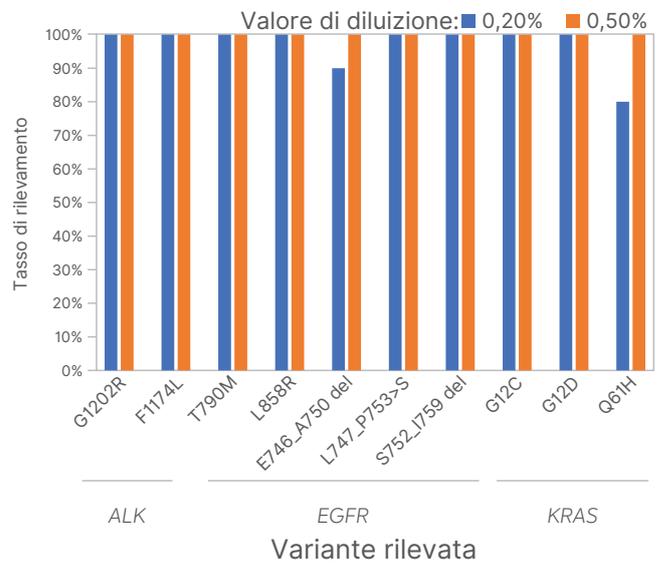


Figura 4: Rilevamento di piccole varianti a bassa VAF. I campioni con VAF nota per ciascuna variante sono stati diluiti a valori compresi tra 0,10 e 1,00% VAF. Cinque replicati di ciascun campione sono stati analizzati con TruSight Oncology 500 ctDNA utilizzando 30 ng di DNA di controllo di riferimento commerciale.

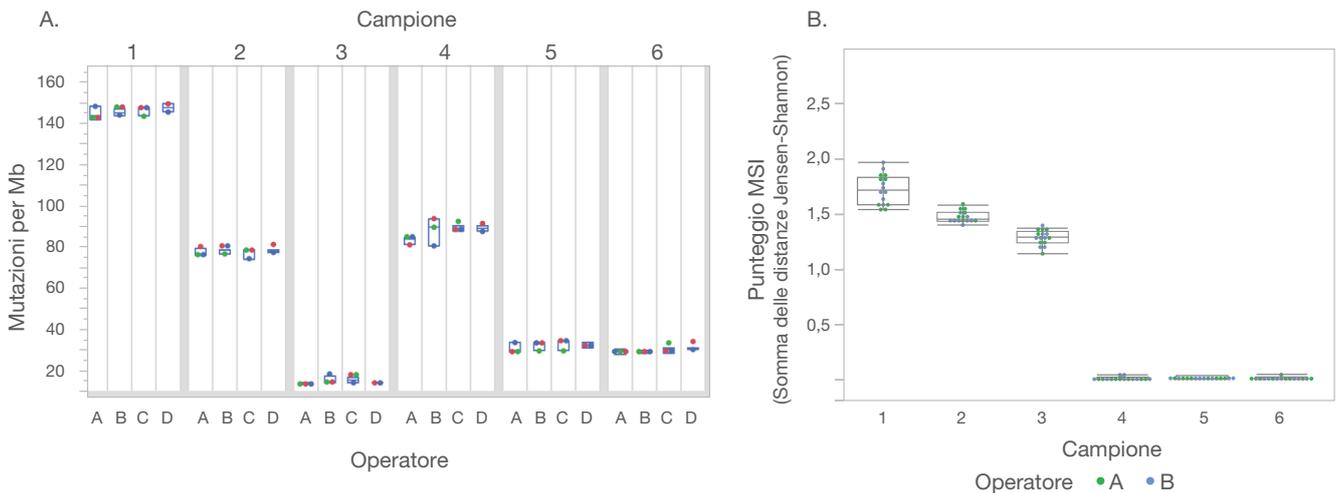


Figura 5: Misurazione riproducibile di TMB e MSI. (A) Il TMB è stato valutato in sei diversi campioni di plasma (1-6) da quattro operatori (A, B, C, D) in triplicato (punti verdi, blu, rossi). (B) La MSI è stata valutata in tre linee cellulari nucleosomiche preparate con stato MSI-alto (campioni 1-3) e tre campioni di cfDNA da tumori MSI-alto a bassa prevalenza (campioni 4-6) da due diversi operatori (A-verde, B-blu).

Tabella 5: Rilevamento sensibile di CNV

Gene	Variazione prevista	Media osservata	Deviazione standard	Tasso di rilevamento
<b>Amplificazioni</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>Delezioni</b>				
<i>BRCA1</i>	0,7	0,7	0	100%
<i>BRCA2</i>	0,6	0,6	0,01	100%

Campioni con livelli noti di variazione per le amplificazioni e le delezioni geniche sono stati valutati usando TruSight Oncology 500 ctDNA con 30 ng di input di cfDNA. Sono stati analizzati cinque replicati di ciascun campione.

## Attributi del prodotto migliorati

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

- **Notifica avanzata delle modifiche:** Illumina informa i laboratori sei mesi prima che vengano apportate modifiche significative a un prodotto del portafoglio TruSight Oncology 500.
- **Certificato di analisi:** ogni prodotto del portafoglio TruSight Oncology 500 viene rilasciato con un certificato di analisi (CoA, certificate of analysis) dal reparto Quality Assurance di Illumina che accerta che il prodotto ha soddisfatto le specifiche e la qualità predeterminate per il rilascio del prodotto.

Tabella 6: Rilevamento della fusione genica a bassa VAF

Fusione genica	VAF prevista	VAF osservata	Deviazione standard	Tasso di rilevamento
<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%

Sono stati valutati campioni con frequenze alleliche di fusione genica note che vanno da circa 0,5% a 4%. Cinque replicati di ciascun campione sono stati analizzati con TruSight Oncology 500 ctDNA con 30 ng di cfDNA in ingresso. La direzionalità della fusione genica è riportata in base all'espressione nota. Per ulteriori informazioni sulla direzionalità delle fusioni basate sul DNA, consultare la [TruSight Oncology 500 ctDNA Local App User Guide](#).

- **Maggiore durata di conservazione:** la durata di conservazione minima garantita per i reagenti TruSight Oncology 500 viene estesa a sei mesi, riducendo il rischio di scadenza del prodotto e consentendo ai laboratori di utilizzare i reagenti in base alle attuali esigenze di analisi.

## Riepilogo

TruSight Oncology 500 ctDNA è un saggio di ricerca multiplex basato su NGS che analizza simultaneamente centinaia di biomarcatori correlati al cancro dal plasma. Il contenuto del saggio è in linea con le attuali linee guida e con le ricerche condotte nei trial clinici. Il singolo saggio completo è in grado di rilevare più tipi di varianti da 523 geni implicati in diversi tipi di tumore, senza richiedere ulteriori campioni per eseguire analisi iterative. TruSight Oncology 500 ctDNA fornisce inoltre una valutazione di biomarcatori immuno-oncologici e Pan-Cancer (TMB, MSI, *NTRK BRAF* e *RET*). Grazie all'ampio contenuto genomico, alla tecnologia di sequenziamento leader del settore e al software avanzato, TruSight Oncology 500 ctDNA offre una soluzione integrata per accelerare i progetti di ricerca clinica con una complessità operativa e di analisi minima.

## Maggiori informazioni

[TruSight Oncology 500 ctDNA](#)

[NovaSeq 6000 System](#)

[Analisi secondaria DRAGEN](#)

[Illumina Connected Analytics](#)

[Illumina Connected Insights](#)

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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>Kit di reagenti per il sequenziamento</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>Creazione di report sulle varianti in sede</b>	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan	20032797
Illumina DRAGEN Server Installation	20031995
<b>Identificazione delle varianti basate sul cloud</b>	
Connected Analytics Basic Annual Subscription	20044874
Connected Analytics Professional Annual Subscription	20044876
Connected Analytics Enterprise Annual Subscription	20038994
Connected Analytics Enterprise Compliance Add-on (si applica solo alla versione Basic)	20066830
Connected Analytics Training and Onboarding	20049422
Connected Analytics Data Storage: Illumina Analytics, 1 credit	20042038
Connected Analytics Data Storage: Illumina Analytics Starter Pack, 1000 credits	20042039
Connected Analytics Data Storage: Illumina Analytics, 5000 credits	20042040
Connected Analytics Data Storage: Illumina Analytics, 50,000 credits	20042041
Connected Analytics Data Storage: Illumina Analytics, 100,000 credits	20042042

## Informazioni per gli ordini (continua)

Prodotto	N. di catalogo
<b>Approfondimenti e generazione di report</b>	
Illumina Connected Insights—Abbonamento annuale	20090137
Illumina Connected Insights—Campione di genomica oncologica equivalente-VCF	20090138
Illumina Connected Insights—Formazione e integrazione	20092376
Servizi professionali di informatica	20071787

## Bibliografia

1. Illumina. Enhanced sequencing capabilities with the NovaSeq 6000 v1.5 Reagent Kit. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013/novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013/novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013.pdf). Pubblicato nel 2020. Consultato il 30 marzo 2022.
2. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. [Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0561-9). *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](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0624). *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](https://illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf). Pubblicato nel 2017. Consultato il 15 marzo 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](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/ica-security-brief-m-gl-00683/ica-security-brief-m-gl-00683.pdf). Pubblicato nel 2022. Consultato il 16 marzo 2022.



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

© 2023 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00843 ITA v5.0