TruSight™ Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq™ 2000 System

Überragende Performance und die Vorteile eines Tischsystems

Performance bei hoher Sensitivität

Nachweis von Biomarkern mit einer VAF von nur 0,2 % aus 20 ng ctDNA (5–30 ng möglich)

Umfassende Ergebnisse

Analyse von über 500 Genen sowie der genomischen Immunonkologie-signaturen bMSI und bTMB in einem Assay

Optimierter Workflow

Dreitägiger Workflow von der cfDNA bis zum Variantenbefund mit vollständig automatisierter Datenanalyse

Kosteneffizienter Durchsatz

Optimierte Sequenzierungskosten pro Probe bei kleinen Batches

Einleitung

Umfassendes genomisches Profiling (CGP, Comprehensive Genomic Profiling) in der Forschung untersucht eine breite Palette von Biomarkern in einem einzigen Assay und liefert schneller Ergebnisse als sequenzielle Tests. Die Bedeutung dieses Ansatzes wächst, da immer mehr Biomarker entdeckt werden, darunter genomische Immunonkologie(IO)-Signaturen wie die Tumormutationslast (TMB, Tumor Mutational Burden), bei denen große NGS-Panels (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) mit über 1 Mb zur genauen Beurteilung zwingend erforderlich sind.[1]

Das CGP erfolgt herkömmlicherweise anhand von solidem Tumorgewebe. Jedoch ist bei bis zu 25 % der Fälle nicht ausreichend Gewebe vorhanden, die Tumoren sind nicht zugänglich oder Ergebnisse sind nicht zeitnah zu erhalten. In diesen Situationen bietet die Analyse der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA, circulating tumor DNA) eine alternative Lösung auf Basis von CGP.[2–5]

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 ermöglicht den Einsatz von CGP in der Forschung anhand von aus Blut gewonnener ctDNA mit breiter Coverage tumorbedingter Veränderungen zur Beurteilung von IO-Signaturen wie blutbasierter TMB (bTMB) und blutbasierter MSI (bMSI). Der Assay ist für den Nachweis seltener Varianten mit hoher analytischer Sensitivität optimiert und filtert mithilfe fortschrittlicher Bioinformatik mit klonaler Hämatopoese assoziierte Varianten und Keimbahnvarianten.[2]

Bestimmte Liquid-Biopsy-Assays erfordern eine ultratiefe Sequenzierung von ctDNA (mindestens 20.000-fach), damit sich maximale analytische Sensitivität erzielen und seltene Varianten nachweisen lassen.[6] In der Vergangenheit hat die Erforderlichkeit eines Sequenziersystems mit hohem Durchsatz, erheblicher Vorabinvestitionen und großer Batches zur Kostensenkung den Einsatz von CGP auf Basis von Liquid-Biopsy-Proben in kleineren Laboren beeinträchtigt.

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 ist der erste Liquid-Biopsy-Assay, der den Einsatz von CGP für die Forschung auf einer Tischplattform – dem NextSeq 2000 System – ermöglicht.[7] Damit steht dieses Verfahren nun auch Laboren ohne Hochdurchsatzsysteme zur Verfügung. Mit der XLEAP-SBS™-Chemie, einer verbesserten Form der Sequenzierung durch Synthese (SBS, Sequencing by Synthesis), erhöht das NextSeq 2000 System die nutzbare Ausgabe pro Fließzelle und ermöglicht die hochpräzise Sequenzierung bei niedrigeren Kosten und geringerem Platzbedarf.[8]

Die wichtigsten Vorteile des Einsatzes von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq 2000 System sind:

- Sensitiver Nachweis seltener Varianten (VAF von ca. 0,2 %) anhand von 20 ng cfDNA mit hoher Spezifität (Tabelle 1)
- Optimierter, dreitägiger Workflow von der cfDNA bis zum Variantenbefund mit vollständig automatisierter Datenanalyse (Abbildung 1)
- Verbesserte Kosteneffizienz durch die höhere nutzbare Ausgabe der XLEAP-SBS-Chemie, die wettbewerbsfähige Preise pro Probe mit Batches von nur vier Proben ermöglicht (Abbildung 2)
- Ausführung von TruSight Oncology 500 und anderen Assays der Onkologieforschung auf demselben Gerät für zahlreiche Laboranwendungen[9*]

Der vorliegende technische Hinweis enthält einen Vergleich der Performance von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq 2000 System mit der Performance auf dem NovaSeq 6000 System. Auf letzterer Plattform wurde der Assay ursprünglich entwickelt. Die Ergebnisse zeigen eine gleichwertige Performance auf beiden Systemen bei signifikant geringeren Vorabinvestitionen und Sequenzierungskosten pro Probe für kleine Batches bei Einsatz des NextSeq 2000 System.

* Onkologie-Assays umfassen genomisches Profiling mit TruSight Oncology 500 und gezielte Tests mit Pillar® oncoReveal™-Panels. Weitere Informationen finden Sie unter Unlock scalable oncology workflows with NextSeq 2000 System (Skalierbare Onkologie-Workflows mit dem NextSeq 2000 System).

Tabelle 1: TruSight Oncology 500 ctDNA v2 – Assayperformance[a]

Parameter	Analytische Sensitivität[b]	Analytische Spezifität[c]
Kleine DNA-Varianten • SNV ≥ 0,2 % VAF (≥ 0,4 % VAF) • SNV-Hotspots ≥ 0,2 % VAF • MNV ≥ 0,5 % VAF • Indels ≥ 0,5 % VAF	 ≥ 90 % (≥ 95 %) ≥ 95 % ≥ 90 % ≥ 90 %	≥ 99,999 %
Genamplifikationen (≥ 1,3-fache Änderung)	≥ 95 %	≥ 95 %
Gendeletionen (≤ 0,6-fache Änderung)	≥ 95 %	≥ 95 %
„MSI high“-Nachweis bei 0,3 % Tumorfraktion	≥ 95 %	≥ 95 %
Genrearrangements ≥ 0,5 % VAF	≥ 95 %	> 95 %

a. Die Performancemerkmale wurden empfehlungsgemäß auf dem NovaSeq 6000 System mit 20 ng cfDNA und 35.000-facher Coverage gemessen. Die Performance war auf dem NextSeq 2000 System und der NovaSeq X Series äquivalent.
b. Die analytische Sensitivität ist die Nachweisrate in Prozent bei der angegebenen Variantenkonzentration.
c. Die analytische Spezifität ist die Fähigkeit zum Nachweis eines bekannten negativen Ergebnisses.
MNV: Multinukleotidvariante; SNV: Single Nucleotide Variant (Einzelnukleotidvariante); VAF: Variantenallelfrequenz.

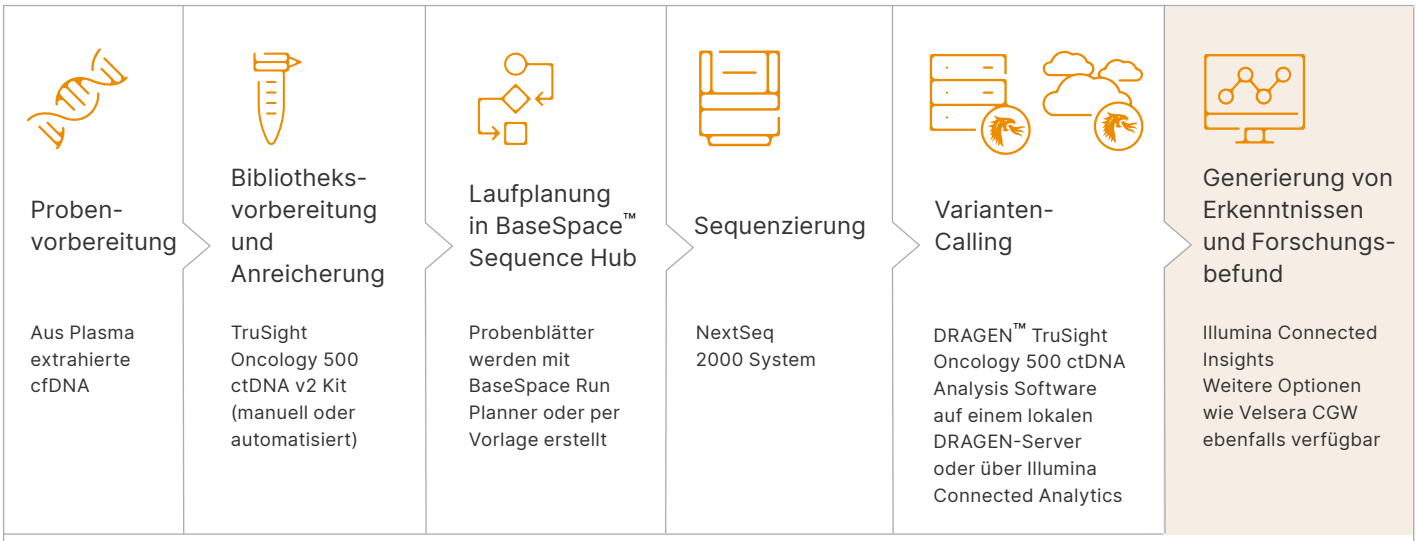


Abbildung 1: Workflow für TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq 2000 System

Die manuelle Bibliotheksvorbereitung nimmt bis zu 8,5 Stunden in Anspruch, ca. 2,5 Stunden sind hierbei manueller Aufwand. BaseSpace Sequence Hub vereinfacht die Laufkonfiguration, die Probenblattgenerierung und die Überwachung des Sequenzierungsstatus. Die Integration in Illumina Connected Analytics und Illumina Connected Insights ermöglicht den automatischen Start von Sekundär- sowie von Tertiäranalysen und damit einen Workflow komplett ohne manuellen Aufwand.

CGW: Clinical Cenomics Workspace.

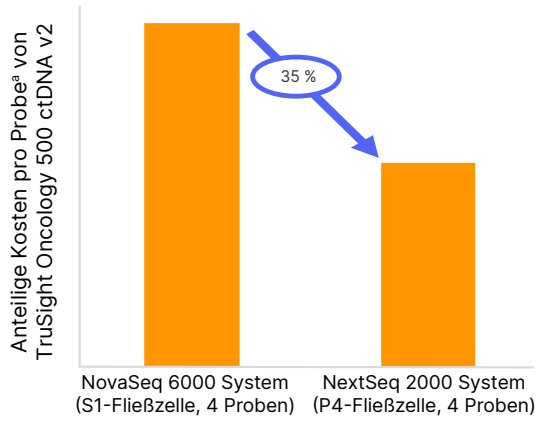


Abbildung 2: Vergleich der Sequenzierungskosten auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System

Die Sequenzierung auf dem NextSeq 2000 System mit einer P4-Fließzelle bietet dank der Wirtschaftlichkeit der XLEAP-SBS-Chemie Vorteile. Im Vergleich zur Sequenzierung mit einer S1-Fließzelle auf dem NovaSeq 6000 System liegen die Kosten pro Probe ca. 35 % niedriger.

a. Die Kostenschätzungen beruhen auf dem Preis in USD für die jeweilige Katalognummer und enthalten Bibliotheksvorbereitung, Indizes und Sequenzierungsverbrauchsmaterialien. Systemkosten sind nicht enthalten.

Methoden

Workflow

Der Workflow für TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq 2000 System entspricht im wesentlichen dem Prozess auf dem NovaSeq 6000 System. Dank Optimierungen sind von der Zugabe zellfreier DNA (cfDNA, cell-free DNA) zum Befund nur drei Tage erforderlich (Abbildung 1 und Tabelle 2).

Bibliotheken werden anhand von mithilfe manueller oder automatisierter Protokolle aus Plasma gewonnener cfDNA vorbereitet, was Skalierbarkeit und konsistente Performance gewährleistet. Für die manuelle Bibliotheksvorbereitung sind ca. 8,5 Stunden erforderlich, wobei der manuelle Aufwand ca. 2,5 Stunden beträgt. Die Konfiguration der Sequenzierung und die Laufüberwachung erfolgen auf der benutzerfreundlichen Oberfläche von BaseSpace Sequence Hub.

Das NextSeq 2000 System lässt sich für das Varianten-Calling und die sichere Datenspeicherung sowie für Qualitätssicherung, Visualisierung, Interpretation und Befunderstellung im Zusammenhang mit Varianten in Illumina Connected Insights integrieren. Die Kombination dieser Lösungen ergibt einen vollständig automatisierten Workflow. Eine manuelle Übertragung der Daten ist nicht erforderlich. Die Sekundär- sowie die Tertiäranalyse werden automatisch eingeleitet, was die Durchlaufzeit verkürzt (selbst in dem Fall, dass die Sequenzierung außerhalb der normalen Arbeitszeiten abgeschlossen wird).

Tabelle 2: Gesamtdurchlaufzeiten

Konfiguration			Laufzeit				
System	Fließzelle	Anzahl der Proben	Bibliotheks-vorbereitung (manuell)	Sequenzierung	DRAGEN-Sekundär-analyse[a]	Connected Insights-Fallbericht	Summe
NextSeq 2000 System	P4	4	8,5 h	44 h	1 h 45 min	20 min	ca. 3 Tage
NovaSeq 6000 System oder NovaSeq 6000Dx System[b]	S1	4	8,5 h	25 h	1 h 45 min	20 min	ca. 2,5 Tage
	S2	8	8,5 h	36 h	2 h 15 min	50 min	ca. 3 Tage
	S4	24	8,5 h	44 h	3 h	2 h 30 min	ca. 3,5 Tage

a. Die Angaben entsprechen der Analysedauer in Illumina Connected Analytics (Cloud) und umfassen 0,5 h in der Warteschlange. Warteschlangenzeiten können variieren.
b. NovaSeq 6000Dx Instrument (RUO-Modus).

Proben

Folgende Proben wurden zur Beurteilung der Assay-Performance verwendet: anhand eines Mixes im Handel erhältlicher Zelllinien gewonnene DNA aus Nukleosomvorbereitung (npDNA, nucleosome prep DNA), cfDNA aus anonymisierten Plasmaproben von Krebspatienten, Referenzstandard Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF 0.5% (SeraCare, Katalog-Nr. 0710-0531) und Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix WT (0%) (SeraCare, Katalog-Nr. 0710-0533) (Tabelle 3).

Die Extraktion von npDNA aus Zelllinien erfolgte mit dem EZ Nucleosomal DNA Prep Kit (Zymo Research, Katalog-Nr. D5220). Plasma-cfDNA wurde mit dem QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit – cfDNA/cfRNA Isolation (QIAGEN, Katalog-Nr. 55114) extrahiert. Das Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix-Kontrollprobenmaterial wird in Form extrahierter Nukleinsäuren bereitgestellt.

Bibliotheksvorbereitung

Die Bibliotheken wurden anhand von 20 ng extrahierter npDNA, cfDNA oder des Seraseq-Referenzstandards unter Verwendung von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (Illumina, Katalog-Nr. 20105899) und IDT for Illumina UMI DNA/RNA Indexes Set A (Illumina, Katalog-Nr. 20034701) und Set B (Illumina, Katalog-Nr. 20034702) vorbereitet. Die Bibliotheksvorbereitung erfolgte gemäß dem in den Anweisungen zum TruSight Oncology 500 ctDNA v2-Kit enthaltenen Protokoll.

Tabelle 3: In der Studie verwendete Proben

Probentyp	Anzahl der Proben	Beschreibung	Details
Zelllinienmix	22	Die npDNA-Zelllinie wird in drei Verdünnungen angemischt, die auf eine VAF im Bereich von 0,1 % bis 0,5 % abzielen.	Folgende Zelllinien wurden verwendet: LoVo, A253, LC-2/ad, Hs 746.T und NA12877.
Klinisch	20	cfDNA aus anonymisiertem Patientenplasma	Von Bioprobenanbietern bezogen
Seraseq	30	Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix (AF 0,5 %), verdünnt mit Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix WT (0 %)	Verdünnungen, die auf eine VAF zwischen 0,1 % und 0,5 % abzielen

cfDNA: cell-free DNA (zellfreie DNA); npDNA: nucleosome prep DNA (DNA aus Nukleosomvorbereitung); VAF: Variantenallelfrequenz.

Sequenzierung

Die Bibliotheken wurden auf dem NovaSeq 6000 System mit S2- oder S4-Fließzellen (NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20028314) und NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20028312) und dem NextSeq 2000 System mit dem NextSeq 2000 P4 XLEAP Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20100992) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf dem NovaSeq 6000 System bzw. dem NextSeq 2000 System mit Paired-End-Reads bei hoher Tiefe, was Sensitivität in Bezug auf seltene Varianten gewährleistet. Für alle Systeme und Fließzellen wurden identische Laufparameter verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sequenzierungslauf-Details

Parameter	Spezifikation
Read-Länge	2 × 151 bp
Anzahl der Zyklen	300
Anzahl der Reads	ca. 800 Millionen Paired-End-Reads je Probe

Analyse

Die Sekundäranalyse erfolgte lokal unter Verwendung der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.6-Pipeline. Die statistischen Analysen wurden mit R 4.2.2 durchgeführt. Die Übereinstimmung des Varianten-Callings auf den beiden Systemen wurde hinsichtlich kleiner Varianten, Kopienzahlvarianten (CNVs, Copy Number Variants), bMSI, bTMB und DNA-Genrearrangements untersucht.

Ergebnisse

Assay-Performance

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 zeichnet sich sowohl auf dem NovaSeq 6000 System als auch auf dem NextSeq 2000 System durch zuverlässige Performance aus. Die Performance des Assays war gemäß den Qualitätssicherungsmetriken sowohl auf dem NovaSeq 6000 System als auch auf dem NextSeq 2000 System reproduzierbar (Abbildung 3). Die mediane Exon-Coverage zeigte eine konsistente Target-Repräsentation mit ausreichender Sequenzierungstiefe für den genauen Variantennachweis. Die genskalierten Medianwerte für die mediane absolute Abweichung (MAD, Median Absolute Deviation) weisen auf eine konsistente, stabile Coverage der Targets innerhalb der einzelnen Gene und über Plattformen hinweg hin. Geringere Werte ermöglichen einen zuverlässigeren Nachweis von Kopienzahländerungen. Die Ergebnisse beider Systeme stimmten in hohem Maße überein.

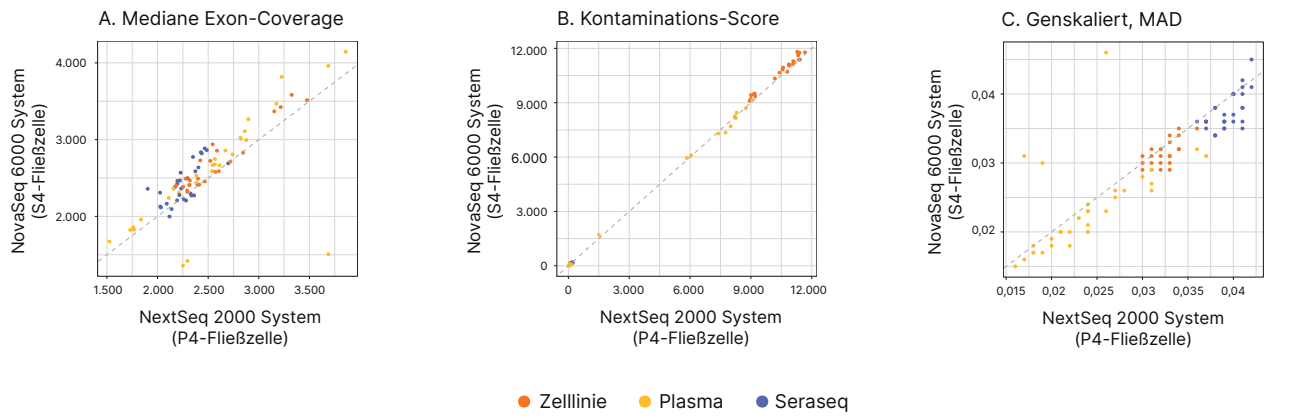


Abbildung 3: Starke geräteübergreifende Übereinstimmung bei der Qualitätssicherung
TruSight Oncology 500 ctDNA v2-Bibliotheken (Zelllinienmix, Seraseq und klinische Patientenproben) wurden auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenziert. (A) Bei der medianen Exon-Coverage zeigte sich eine konsistente Target-Repräsentation mit ausreichender Sequenzierungstiefe für den präzisen Variantennachweis. (B) Die Kontaminationswerte waren systemübergreifend konsistent. Es sei darauf hingewiesen, dass bestimmte Plasmaproben aufgrund der Mischung von zwei eindeutigen Proben zum Erhalt einer geeigneten Zugabemenge einen erhöhten Kontaminationswert aufwiesen. (C) Anhand der genskalierten medianen absoluten Abweichung (MAD, Median Absolute Deviation) zur Beurteilung der Variabilität in der Kopienzahlanalyse auf Genebene zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Systemen.

Nachweis kleiner Varianten

Kleine Varianten sind die häufigste Klasse somatischer Veränderungen bei Tumorgenomen und bilden einen wichtigen Bestandteil des CGP.[10] Das Calling kleiner Varianten erfolgt mit der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software anhand von zwei Methoden, der spaltenweisen Häufigkeitsanalyse und der lokalen *De-novo*-Assemblierung von Haplotypen. Letztere dehnt den Variantennachweis auf größere Insertionen und Deletionen sowie phasengleiche Varianten wie Multinukleotidvarianten (MNVs) und Deletions-Insertions-Varianten (Deline) aus. Die Software ermöglicht anhand von Fehlerunterdrückung auf Unique Molecular Identifier(UMI)-Basis Varianten-Calling mit hoher Genauigkeit und berücksichtigt das Hintergrundrauschen mithilfe einer Systemrauschdatei, die anhand einer Reihe von cfDNA-Normalbibliotheken erstellt wurde.

Die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software untersucht sämtliche beim Calling ermittelte Varianten darauf, ob es sich um somatische, Keimbahn- oder mit klonaler Hämatopoese assoziierte Varianten handelt. Diese Klassifizierung wird für nachgeschaltete Berechnungen verwendet, beispielsweise im Zusammenhang mit der bTMB und der maximalen somatischen Allelfrequenz (MSAF). Bei der MSAF handelt es sich um die höchste Allelfrequenz bei den nachgewiesenen somatischen Varianten. Sie wird von der Software ermittelt und kann zur Bewertung der Tumorfraktion herangezogen werden.

Die Beurteilung von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System umfasste den Nachweis von Einzelnukleotid-Varianten (SNVs, Single-Nucleotide Variants), Deletionen und Insertionen. Die Übereinstimmung zwischen den Plattformen war bei allen Variantentypen hoch, was eine konsistente Performance des Assays belegt (Abbildung 4 und Abbildung 5).

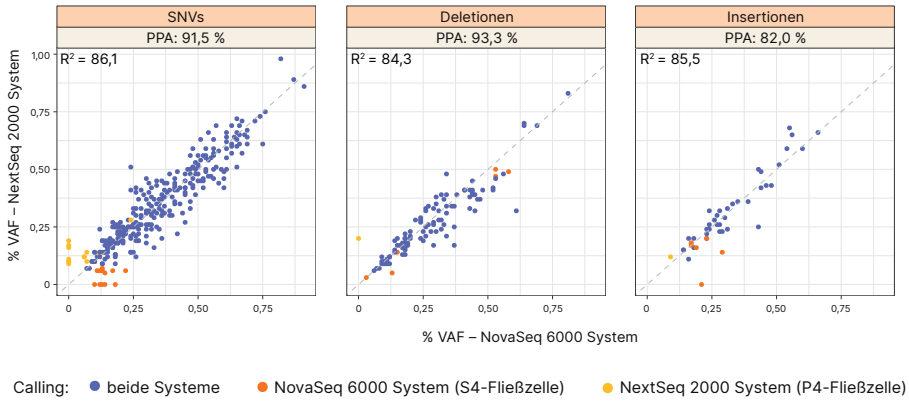


Abbildung 4: Starke Übereinstimmung über Variantentypen hinweg
Die TruSight Oncology 500 ctDNA v2-Bibliotheken (Zelllinienmix, Seraseq und Plasmaproben) wurden auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenziert. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung der Variantenallelfrequenz (VAF) zum Nachweis von Einzelnukleotid-Varianten (SNVs, Single-Nucleotide Variants), Deletionen und Insertionen.
PPA: Positive Percent Agreement (positive prozentuale Übereinstimmung.

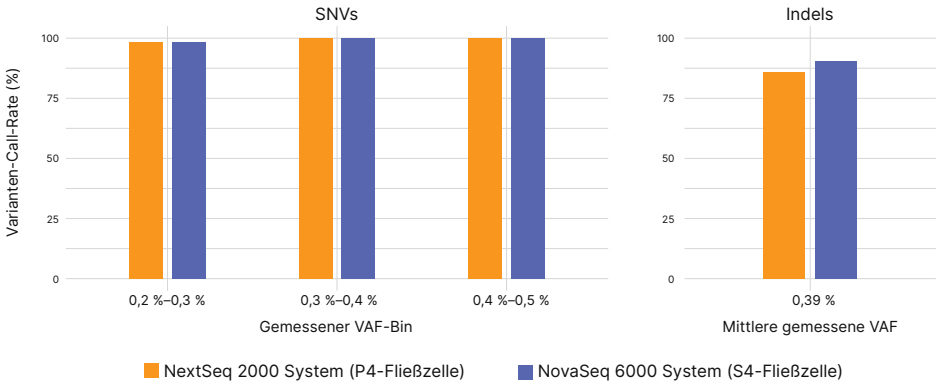


Abbildung 5: Hohe Übereinstimmung beim Calling kleiner Varianten
Der Nachweis kleiner Varianten wurde anhand von Seraseq-Kontrollproben untersucht. Eine Call-Rate von 100 % gibt an, dass alle erwarteten Varianten nachgewiesen wurden. Bei allen Variantentypen war die Übereinstimmung der Call-Raten zwischen dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System hoch.
Indels: Insertionen und Deletionen; SNVs: Small Nucleotide Variants (kleine Nukleotidvarianten); VAF: Variantenallelfrequenz.

CNV-Nachweis

Kopienzahländerungen haben entscheidenden Anteil an der Entstehung, Progression und Behandlungsresistenz von Krebs.[11] Die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software nutzt für das CNV-Calling ein Normalpanel (ein aus Proben ohne bekannte somatische Veränderungen zusammengestelltes Referenzpanel) sowie für Forschungszwecke erstellte Proben, anhand derer sich technische Verzerrungen und Artefakte ausschließen lassen. Die enthaltene zusätzliche Korrektur der GC-Verzerrung reduziert die Coverage-Variabilität im Zusammenhang mit GC-Inhalten und erhöht die Genauigkeit des CNV-Callings.

Die Performance des Assays zum Nachweis von Genamplifikationen und Deletionen wurde anhand von Zelllinienmixen und einer Seraseq-Kontrollprobe mithilfe von Messungen der x-fachen Änderung bestimmt. Die Daten des NovaSeq 6000 System und des NextSeq 2000 System zeigen eine hohe Übereinstimmung sowohl für Amplifikations- als auch für Deletionsereignisse (Abbildung 6 und Tabelle 5). Der Einsatz von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq 2000 System ermöglicht das Calling bei einer Nachweisgrenze bei ≥ 1,3-facher Änderung für Amplifikationen und ≤ 0,6-facher Änderung für Deletionen (Tabelle 5).

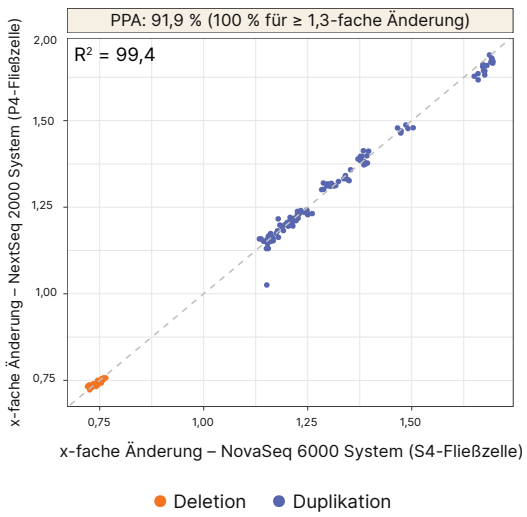


Abbildung 6: Übereinstimmung der Messungen der x-fachen Änderung bei der CNV-Analyse
TruSight Oncology 500 ctDNA v2-Bibliotheken (Zelllinienmix und Seraseq) wurden auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenziert. Anhand der zur genübergreifenden Beurteilung von Kopienzahlvarianten (CNVs, Copy-Number Variants) herangezogenen Werte für die x-fache Änderung zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Plattformen, die den zuverlässigen CNV-Nachweis bestätigt.
PPA: Positive Percent Agreement (positive prozentuale Übereinstimmung).

Tabelle 5: Vergleich der analytischen Performance von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 bei CNVs

Probentyp	x-fache Änderung	
	NovaSeq 6000 System (S4-Fließzelle)	NextSeq 2000 System (P4-Fließzelle)
Zelllinienmixe bei drei Verdünnungen (Tabelle 3)		
AR	0,745	0,746
AR	0,753	0,748
AR	0,732	0,734
CDK4	1,180	1,163
MET	1,340	1,331
MET	1,241	1,232
MET	1,161	1,158
MYC	1,689	1,675
MYC	1,671	1,643
MYC	1,482	1,476
Seraseq – unverdünnt (0,5 % VAF)		
ERBB2	1,300	1,312
MET	1,384	1,391
MYC	1,211	1,207

Die Proben mit Kopienzahlvarianten wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System untersucht. Die Amplifikationen wurden mit dem ctDNA-Referenzstandard von Seraseq bei einer VAF von 0,5 % und Zelllinienmixen bei drei Verdünnungen untersucht. Deletionen wurden mit Zelllinienmixen untersucht. Die Nachweisgrenze (LOD, Limit of Detection) wurde für Amplifikationen auf ≥ 1,3 und für Deletionen auf ≤ 0,6 festgelegt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um anhand von sechs Replikaten ermittelte Durchschnittswerte für die x-fache Änderung.

Nachweis von Genrearrangements

Genrearrangements sind komplexe Varianten, die für das CGP einen zuverlässigen Nachweis erfordern.[12] Die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software ermittelt Genrearrangements mithilfe der graphischen Analyse der Evidenz für strukturelle Varianten, einschließlich Split- und Spanning-Reads. Anschließend werden die Daten im Rahmen einer Reihe von Analyse- und Filterschritten verarbeitet, darunter UMI-basierte Deduplizierung zur Verfeinerung der Varianten-Calls. Bestätigende Reads liefern einen direkten Nachweis für Rearrangement-Bruchpunkte und helfen bei der Unterscheidung echter Ereignisse von Sequenzierungsartefakten.

Mithilfe von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 ließ sich eine hohe Übereinstimmung des Fusionsnachweises auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System zeigen (Abbildung 7 und Tabelle 6).

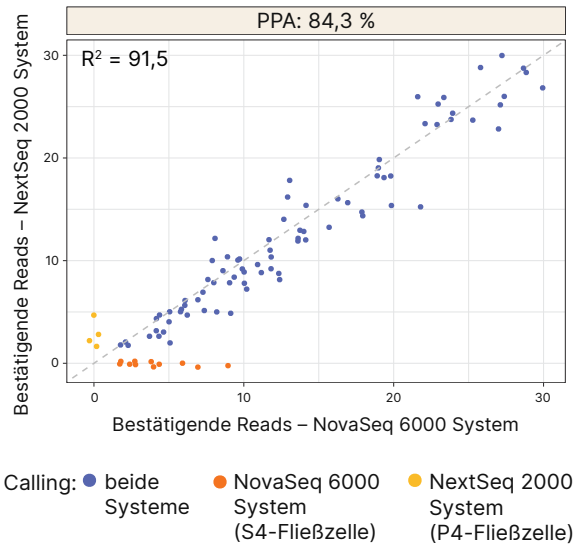


Abbildung 7: Hohe Übereinstimmung beim Nachweis von DNA-Fusionen

Bei den auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenzierten TruSight Oncology 500 ctDNA v2-Bibliotheken (Zelllinienmix und Seraseq) zeigte sich eine hohe Übereinstimmung beim Nachweis von DNA-Fusionen.

PPA: Positive Percent Agreement (positive prozentuale Übereinstimmung).

Tabelle 6: Performance bei der Analyse von Genrearrangements

Probentyp	Gen	Verdünnungsgrad	Durchschnittliche Variantenallelfrequenz (VAF)	
			NovaSeq 6000 System	NextSeq 2000 System
Zelllinienmix	*CCDC6-RET*	1	0,52 %	0,56 %
	CCDC6-RET	2	0,43 %	0,44 %
	CCDC6-RET	3	0,48 %	0,47 %
Seraseq	*CD74-GOPC;ROS1*	Unverdünnt	0,35 %	0,33 %
	EML4-ALK	Unverdünnt	0,32 %	0,31 %
	NCOA4-RET	Unverdünnt	0,13 %	0,15 %
	CD74-GOPC;ROS1	1	0,12 %	0,15 %
	EML4-ALK	1	0,20 %	0,16 %
	CD74-GOPC;ROS1	2	0,15 %	0,13 %
	EML4-ALK	2	0,12 %	0,17 %

Die Zelllinienmixe wurden in drei Verdünnungsstufen untersucht. Der Seraseq cfDNA-Referenzstandard wurde unverdünnt (0,5 % AF) und in zwei Verdünnungsstufen (Tabelle 3) unter Verwendung von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 getestet und auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenziert. Die Werte stellen einen anhand von sechs technischen Replikaten einer einzelnen Verdünnungsstufe ermittelten Durchschnitt dar.

IO-Signaturen: Bestimmung von bMSI und bTMB

Die Bewertung der IO-Signaturen mit TruSight Oncology 500 ctDNA v2 umfasst die Untersuchung von bMSI und bTMB. Die bMSI weist auf Defekte der Signalwege für die DNA-Mismatch-Reparatur hin und dient als Marker für genomweite Instabilität.[13] Die bTMB gibt die Gesamtzahl somatischer Mutationen in codierenden Regionen an und quantifiziert die Mutationslast.[1]

Der bMSI-Status wird aus der Variabilität in Bezug auf mehrere Genom-Loci abgeleitet, wobei die Jensen-Shannon-Divergenz (sumJSD) als Bewertungsmetrik herangezogen wird. Bei der Analyse auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System zeigte sich eine hohe Übereinstimmung bei der Bestimmung des bMSI-Status (Abbildung 8).

Eine zuverlässige Bestimmung der bTMB erfordert Sequenzierungspanels, die mindestens 1,1 Mb der codierenden Sequenz umfassen.[14, 15] TruSight Oncology 500 ctDNA v2 deckt ca. 1,3 Mb ab, was die Berechnung der bTMB anhand von cfDNA ermöglicht. Die Ergebnisse für die Bestimmung der bTMB bei für Forschungszwecke erstellten und Plasmaproben stimmten auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System überein (Abbildung 9).

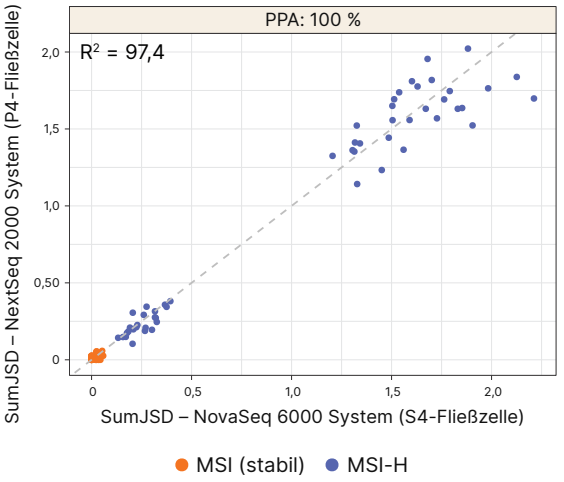


Abbildung 8: Übereinstimmung des bMSI-Status
Seraseq-Kontrollproben, Zelllinienmixe und Plasmaproben wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA v2 vorbereitet und auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenziert. Die analytische Sensitivität bezüglich des MSI-Status (Mikrosatelliteninstabilität) wurde mit der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.6 Analysis Software bestimmt. Die Ergebnisse weisen auf eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den beiden Systemen hin.
MSI-H: Mikrosatelliteninstabilität hoch; PPA: Positive Percent Agreement (positive prozentuale Übereinstimmung).

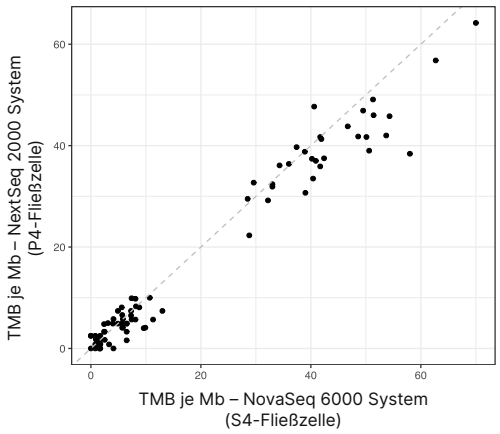


Abbildung 9: Hohe Übereinstimmung der bTMB-Analyse
Die TruSight Oncology 500 ctDNA v2-Bibliotheken (Zelllinienmix, Seraseq und klinische Proben) wurden auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 2000 System sequenziert. Die blutbasierte Tumormutationslast (bTMB, blood-based Tumor Mutational Burden) wurde mit der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.6 Analysis Software bestimmt.

Zusammenfassung

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 ermöglicht den Einsatz von CGP auf Basis von ctDNA in der Forschung und eignet sich für den Nachweis zahlreicher Variantenklassen und Genomsignaturen anhand einer minimalinvasiven Blutentnahme. Das NextSeq 2000 System ist eine Tischsequenzierungslösung, die anhand von XLEAP-SBS-Chemie und optimierter Reagenzienhandhabung hochwertige Daten liefert. Mit der Implementierung von TruSight Oncology 500 ctDNA v2 auf dem NextSeq 2000 System stehen ein kostengünstiger, hochgradig sensitiver Assay und ein optimierter dreitägiger Workflow mit vollständig automatisierter Analyse zur Verfügung.[2]

Die Übereinstimmung mit auf dem NovaSeq 6000 System ermittelten Daten konnte bei allen wichtigen Variantenklassen gezeigt werden, darunter kleine Varianten, CNVs, Genrearrangements sowie die IO-Signaturen bMSI und bTMB. Neben TruSight Oncology 500 ctDNA v2 ist das NextSeq 2000 System auch mit TruSight Oncology 500 kompatibel, der Illumina-Lösung für CGP auf Basis von Gewebe in der Forschung, die Flexibilität hinsichtlich unterschiedlicher Laborworkflows ermöglicht.

Weitere Informationen →

TruSight Oncology 500 ctDNA v2

NovaSeq 6000 System

NextSeq 2000 System

Quellen

1. Sha D, Jin Z, Budczies J, Kluck K, Stenzinger A, Sinicrope FA. Tumor mutational burden as a predictive biomarker in solid tumors. *Cancer Discov.* 2020;10(12):1808-1825. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0522
2. Illumina. TruSight Oncology 500 ctDNA v2 data sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-ctdna-v2-m-gl-02196/tso500-ctdna-v2-data-sheet-m-gl-02196.pdf. Veröffentlicht 2025. Aufgerufen am 23. September 2025. Illumina.
3. Illumina. Liquid biopsy and NGS: Driving translational clinical research to the next level. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appspotlights/ngs-liquid-biopsy-app-spotlight-1170-2019-007.pdf. Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 23. September 2025.
4. Illumina. Next-generation sequencing and microarray methods for liquid biopsy in cancer research. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/cancer-research-liquid-biopsy-ebook-m-gl-00678.pdf. Veröffentlicht 2024. Aufgerufen am 5. Dezember 2025.
5. 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
6. Lockwood CM, Borsu L, Cankovic M, et al. Recommendations for cell-free DNA assay validations: A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2023;25(12):876-897. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.09.004e
7. Archivdaten. Illumina, Inc. 2025.
8. NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems specification sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008.pdf. Veröffentlicht 2025. Aufgerufen am 23. September 2025.
9. Illumina. Unlock scalable oncology workflows with NextSeq 2000 System. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/oncology-workflows-flyer-m-gl-03764/oncology-workflows-flyer-m-gl-03764.pdf. Veröffentlicht 2025. Aufgerufen am 12. Dezember 2025.
10. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013;502(7471):333-339. doi:10.1038/nature12634
11. Beroukhim 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
12. Gao Q, Liang WW, Foltz SM, et al. Driver fusions and their implications in the development and treatment of human cancers. *Cell Rep.* 2018;23(1):227-238.e3. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.050
13. Kavun A, Veselovsky E, Lebedeva A, et al. Microsatellite instability: A review of molecular epidemiology and implications for immune checkpoint inhibitor therapy. *Cancers.* 2023;15(8):2288. doi:10.3390/cancers15082288
14. 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. doi:10.1186/s13073-017-0424-2
15. 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

illumina®

1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 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-03798 DEU v1.0