TruSight™ Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq™ 2000 System

Prestazioni senza compromessi con i vantaggi di un sistema da banco

Prestazioni altamente sensibili

Rilevamento dei biomarcatori presenti a partire dallo 0,2% di VAF da 20 ng di ctDNA (5-30 ng possibili)

Risultati completi

Analisi di oltre 500 geni e firme genomiche immuno-oncologiche bMSI e bTMB in un unico saggio

Flusso di lavoro semplificato

Flusso di lavoro di tre giorni dal cfDNA al report delle varianti con analisi completamente automatizzata dei dati

Processività conveniente

Ottimizzazione del costo del sequenziamento per campione per i lotti piccoli

Introduzione

La mappatura genomica completa (CGP, Comprehensive Genomic Profiling) valuta un'ampia gamma di biomarcatori in un unico saggio, fornendo risultati più rapidi rispetto ai test sequenziali. L'importanza di questo approccio aumenta man mano che emergono più biomarcatori, tra cui le firme genomiche immuno-oncologiche (IO, Immuno-Oncology) come il carico mutazionale del tumore (TMB, Tumor Mutational Burden), che per essere valutato in maniera accurata richiede appositi pannelli di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) di grandi dimensioni (oltre 1 Mb).[1]

La CGP si basa tradizionalmente sul tessuto tumorale solido; tuttavia, fino al 25% dei casi risente di problemi quali carenza di tessuto, inaccessibilità dei tumori o impossibilità di fornire risultati tempestivi. In queste situazioni, la biopsia liquida, che analizza il DNA tumorale circolante (ctDNA, circulating tumor DNA), è un'utile alternativa di CPG.[2-5]

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 consente la ricerca CGP a partire dal ctDNA basato sul sangue, offrendo ampia copertura delle alterazioni derivate dal tumore e capacità di valutazione delle firme IO, come il TMB basato sul sangue (bTMB, blood-based TMB) e l'MSI basata sul sangue (bMSI, blood-based MSI). Il saggio è ottimizzato per identificare le varianti a bassa frequenza con elevata sensibilità analitica e utilizza la bioinformatica avanzata per filtrare le varianti associate all'ematopoiesi clonale e quelle della linea germinale.[2]

Alcuni saggi di biopsia liquida richiedono il sequenziamento ultraprofondo del ctDNA (20.000× o più) per massimizzare la sensibilità analitica e rilevare le varianti a bassa frequenza.[6] Questo aspetto ha da sempre rappresentato un limite all'adozione della CGP da biopsia liquida nei laboratori più piccoli, a causa dei requisiti del sistema di sequenziamento ad alta processività, del sostanziale investimento di capitale iniziale e della necessità di batch di grandi dimensioni per contenere i costi.

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 è il primo saggio di biopsia liquida che consente la ricerca CGP su una piattaforma da banco: NextSeq 2000 System.[7] Questa modalità di analisi diventa così accessibile anche ai laboratori che non utilizzano sistemi a elevata processività. Sfruttando la chimica XLEAP-SBS™, una forma migliorata di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesing), NextSeq 2000 System aumenta l'output utilizzabile per cella a flusso e consente il sequenziamento ad alta fedeltà; il risultato è un sistema più compatto e più efficiente in termini di costi.[8]

L'esecuzione di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq 2000 System comporta diversi vantaggi:

- Rilevamento sensibile e ad alta specificità delle varianti a bassa frequenza (VAF dello 0,2% circa) da 20 ng di cfDNA (Tabella 1)
- Flusso di lavoro semplificato e di soli tre giorni dal cfDNA al report delle varianti, con analisi completamente automatizzata dei dati (Figura 1)
- Maggiore efficienza in termini di costi grazie all'output utilizzabile più elevato fornito dalla chimica XLEAP-SBS, che consente a sua volta prezzi competitivi per campione con batch piccoli, anche di appena quattro campioni (Figura 2)
- Esecuzione di TruSight Oncology 500 e altri saggi di ricerca oncologica sullo stesso strumento per soddisfare un'ampia gamma di esigenze di laboratorio[9*]

Questa nota tecnica confronta le prestazioni di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq 2000 System con le prestazioni dello stesso saggio sulla piattaforma su cui è stato originariamente sviluppato, ossia NovaSeq 6000 System. I risultati mostrano prestazioni equivalenti sui due sistemi, con investimenti iniziali e costi di sequenziamento per campione notevolmente inferiori con NextSeq 2000 System per lotti di campioni di dimensioni ridotte.

* I saggi oncologici includono la mappatura genomica con TruSight Oncology 500 e test mirati con i pannelli Pillar® oncoReveal™. Consultare il documento Unlock scalable oncology workflows with NextSeq 2000 System (Flussi di lavoro oncologici scalabili con NextSeq 2000 System).

Tabella 1: prestazioni del saggio TruSight Oncology 500 ctDNA v2[a]

Parametro	Sensibilità analitica[b]	Specificità analitica[c]
Varianti piccole di DNA • SNV ≥ 0,2% di VAF (≥ 0,4% di VAF) • Hotspot SNV ≥ 0,2% di VAF • MNV ≥ 0,5% di VAF • Indel ≥ 0,5% di VAF	 ≥ 90% (≥ 95%) ≥ 95% ≥ 90% ≥ 90%	≥ 99,999%
Amplificazioni geniche Variazione ≥ 1,3 volte	≥ 95%	≥ 95%
Delezioni geniche Variazione ≤ 0,6 volte	≥ 95%	≥ 95%
Rilevamento MSI-high a una frazione tumorale dello 0,3%	≥ 95%	≥ 95%
Riarrangiamenti genici ≥ 0,5% di VAF	≥ 95%	> 95%

a. Le caratteristiche prestazionali sono state misurate su NovaSeq 6000 System secondo le raccomandazioni, utilizzando 20 ng di cfDNA e copertura di 35.000x. Sono state osservate prestazioni equivalenti su NextSeq 2000 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.
MNV (Multinucleotide Variant), variante multinucleotidica; SNV (Single Nucleotide Variant), variante a singolo nucleotide; VAF (Variant Allele Frequency), frequenza allelica delle varianti.



Figura 1: flusso di lavoro di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq 2000 System
La preparazione manuale delle librerie richiede fino a 8,5 ore, incluse circa 2,5 ore di interventi manuali. BaseSpace Sequence Hub facilita la configurazione della corsa, la generazione dei fogli campioni e il monitoraggio dello stato del sequenziamento. L'integrazione con Illumina Connected Analytics e Illumina Connected Insights consente l'avvio automatico dell'analisi secondaria e terziaria per un flusso di lavoro privo di interventi manuali.
CGW, Clinical Genomics Workspace.

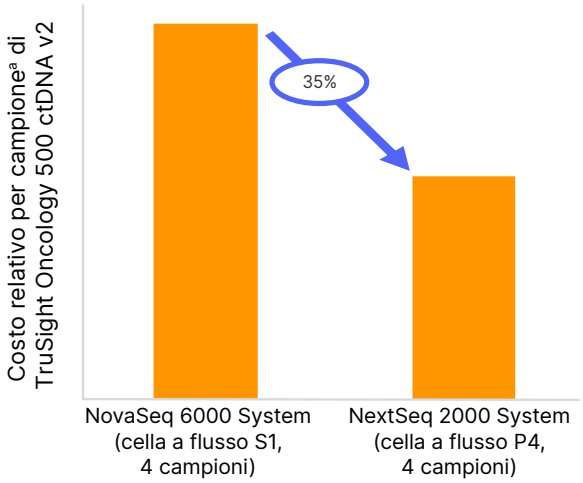


Figura 2: confronto dei costi del sequenziamento su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System
Il sequenziamento su NextSeq 2000 System con cella a flusso P4 beneficia dell'economia della corsa basata sulla chimica XLEAP-SBS e consente di ridurre di circa il 35% il costo per campione rispetto al sequenziamento con cella a flusso S1 su NovaSeq 6000 System.
a. Le stime dei costi si basano sul prezzo in USD associato al numero di catalogo e tengono conto dei materiali di consumo per preparazione delle librerie, indici e sequenziamento; i costi dei sistemi non sono inclusi.

Metodi

Flusso di lavoro

Il flusso di lavoro di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq 2000 System segue lo stesso processo generale utilizzato su NovaSeq 6000 System e offre un percorso ottimizzato, della durata di soli tre giorni, dall'input di DNA libero circolante (cfDNA, cell-free DNA) alla generazione di report (Figura 1 e Tabella 2).

Le librerie vengono preparate con cfDNA derivato dal plasma e mediante protocolli manuali o automatizzati, per assicurare scalabilità e coerenza delle prestazioni. La preparazione manuale delle librerie richiede circa 8,5 ore, incluse circa 2,5 ore di interventi manuali. La configurazione del sequenziamento e il monitoraggio della corsa vengono eseguiti tramite l'interfaccia intuitiva di BaseSpace Sequence Hub.

NextSeq 2000 System si integra con Illumina Connected Analytics per l'identificazione di varianti e l'archiviazione sicura dei dati e con Illumina Connected Insights per il controllo qualità, la visualizzazione, l'interpretazione e la creazione di report delle varianti. Insieme, queste soluzioni danno vita a un flusso di lavoro completamente automatizzato, che elimina i trasferimenti manuali di dati e conta sull'avvio automatico dell'analisi secondaria e terziaria per ridurre i tempi di risposta, anche quando il sequenziamento viene completato al di fuori del normale orario di lavoro.

Tabella 2: tempi di elaborazione end-to-end

Configurazione			Durata della corsa				
Sistema	Cella a flusso	N. di campioni	Preparazione delle librerie (manuale)	Sequenziamento	Analisi secondaria DRAGEN[a]	Report dei casi Connected Insights	Totale
NextSeq 2000 System	P4	4	8,5 ore	44 ore	1 ora e 45 minuti	20 minuti	Circa 3 giorni
NovaSeq 6000 System o NovaSeq 6000Dx System[b]	S1	4	8,5 ore	25 ore	1 ora e 45 minuti	20 minuti	Circa 2,5 giorni
	S2	8	8,5 ore	36 ore	2 ore e 15 minuti	50 minuti	Circa 3 giorni
	S4	24	8,5 ore	44 ore	3 ore	2 ore e 30 minuti	Circa 3,5 giorni

a. I tempi indicati corrispondono alla durata dell'analisi in Illumina Connected Analytics (cloud) e includono un tempo di coda di 0,5 ore; i tempi di coda possono variare.
b. NovaSeq 6000Dx Instrument in modalità RUO.

Campioni

Per valutare le prestazioni del saggio, sono stati utilizzati campioni quali DNA preparato a partire dal nucleosoma (npDNA, nucleosome prep DNA), derivato da una miscela di linee cellulari disponibili in commercio, cfDNA ottenuto da campioni di plasma deidentificati provenienti da pazienti oncologici, lo standard di riferimento Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF 0.5% (SeraCare, n. di catalogo 0710-0531) e Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix WT (0%) (SeraCare, n. di catalogo 0710-0533) (Tabella 3).

L'estrazione di npDNA dalle linee cellulari è stata eseguita con EZ Nucleosomal DNA Prep Kit (Zymo Research, n. di catalogo D5220). Il cfDNA plasmatico è stato estratto con QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit – cfDNA/cfRNA Isolation (QIAGEN, n. di catalogo 55114). Il materiale di controllo Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix è stato fornito sotto forma di acidi nucleici estratti.

Preparazione delle librerie

Le librerie sono state preparate a partire da 20 ng di npDNA estratto, cfDNA o standard di riferimento Seraseq utilizzando TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (Illumina, n. di catalogo 20105899) e IDT for Illumina UMI DNA/RNA Indexes Set A (Illumina, n. di catalogo 20034701) e Set B (Illumina, n. di catalogo 20034702). La preparazione delle librerie ha seguito il protocollo indicato nelle istruzioni del kit TruSight Oncology 500 ctDNA v2.

Tabella 3: campioni utilizzati nello studio

Tipo di campione	N. di campioni	Descrizione	Dettagli
Miscela di linee cellulari	22	Miscele di linee cellulari di npDNA a tre diluizioni, con VAF target dallo 0,1% allo 0,5%	Le linee cellulari includevano LoVo, A253, LC-2/ad, Hs 746.T ed NA12877
Clinico	20	cfDNA da plasma deidentificato di pazienti	Ottenuto da fornitori di campioni biologici
Seraseq	30	Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix (AF 0.5%), diluito con Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix WT (0%)	Diluizioni con VAF target dallo 0,1% allo 0,5%

cfDNA (cell-free DNA), DNA libero circolante; npDNA (nucleosome prep DNA), DNA preparato a partire dal nucleosoma; VAF (Variant Allele Frequency), frequenza allelica delle varianti.

Sequenziamento

Le librerie sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System utilizzando le celle a flusso S2 o S4 [NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles), Illumina, n. di catalogo 20028314 e NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles), Illumina, n. di catalogo 20028312)] e su NextSeq 2000 System utilizzando NextSeq 2000 P4 XLEAP Reagent Kit (300 cycles), Illumina, n. di catalogo 20100992. Il sequenziamento è stato eseguito su NovaSeq 6000 System o NextSeq 2000 System con letture paired-end ad alta profondità per assicurare la sensibilità necessaria al rilevamento di varianti a bassa frequenza. Per tutti i sistemi e le celle a flusso sono stati impiegati i medesimi parametri della corsa (Tabella 4).

Tabella 4: dettagli della corsa di sequenziamento

Parametro	Specifica
Lunghezza lettura	2 × 151 bp
N. di cicli	300
N. di letture	Circa 800 milioni di letture paired-end per campione

Analisi

L'analisi secondaria è stata eseguita localmente con la pipeline DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.6. Le analisi statistiche sono state eseguite con R 4.2.2. La concordanza tra i due sistemi nell'identificazione di varianti è stata valutata per varianti piccole, varianti del numero di copie (CNV, Copy Number Variant), bMSI, bTMB e riarrangiamenti genici nel DNA.

Risultati

Prestazioni del saggio

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 ha prestazioni affidabili sia su NovaSeq 6000 System sia su NextSeq 2000 System. In base alle metriche di controllo qualità, il saggio ha mostrato prestazioni riproducibili sia su NovaSeq 6000 System che su NextSeq 2000 System (Figura 3). La copertura esonica mediana ha dimostrato la rappresentazione coerente del target, con profondità di sequenziamento sufficiente a consentire il rilevamento accurato delle varianti. I valori di deviazione mediana assoluta (MAD, Median Absolute Deviation) su scala genetica indicano la copertura coerente e stabile dei target in ciascun gene e sulle due piattaforme. Valori inferiori indicano maggiore affidabilità del rilevamento di variazioni del numero di copie. Sono stati osservati risultati fortemente concordanti sui due sistemi.

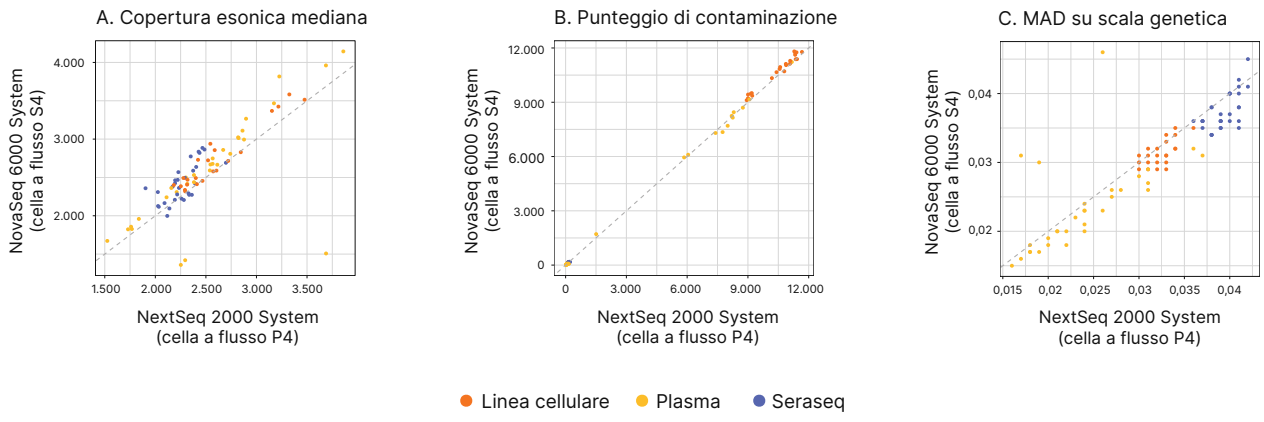


Figura 3: forte concordanza del controllo qualità tra strumenti
Le librerie di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (miscela di linee cellulari, Seraseq e campioni clinici di pazienti) sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. (A) La copertura esonica mediana ha dimostrato la rappresentazione coerente del target, con profondità di sequenziamento sufficiente a consentire il rilevamento accurato delle varianti. (B) I punteggi di contaminazione sono risultati coerenti tra i sistemi. Si noti che alcuni campioni di plasma presentavano un punteggio di contaminazione elevato a causa della miscelazione di due campioni univoci al fine di ottenere la quantità di input corretta. (C) La deviazione mediana assoluta (MAD, Median Absolute Deviation) su scala genetica, utilizzata per valutare la variabilità nell'analisi del numero di copie a livello di gene, è risultata altamente concordante sui due sistemi.

Rilevamento di varianti piccole

Le varianti piccole sono la classe più comune di alterazioni somatiche nei genomi tumorali e rappresentano una componente fondamentale della CGP.[10] Per identificare le varianti piccole, il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA utilizza due metodi: l'analisi del pileup per colonna e l'assemblaggio locale *de novo* degli aplotipi. Quest'ultimo metodo estende il rilevamento delle varianti alle inserzioni e delezioni più grandi, nonché alle varianti con codeterminazione delle fasi, come le varianti multinucleotidiche (MNV, Multinucleotide Variant) e le varianti di tipo delezione-inserzione (delin). Per ottenere un'identificazione di varianti ad alta precisione, il software utilizza la soppressione degli errori basata su identificatori molecolari univoci (UMI, Unique Molecular Identifier) e tiene conto del rumore di fondo mediante un file del rumore sistematico creato a partire da una raccolta di librerie di cfDNA normali.

Il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA valuta ogni variante identificata per stabilire se si tratti di variante somatica, della linea germinale o associata all'ematopoiesi clonale. Questa classificazione guida i calcoli a valle, inclusi quelli relativi a bTMB e massima frequenza allelica somatica (MSAF, Maximum Somatic Allele Frequency). La MSAF, ossia la frequenza allelica più elevata tra le varianti somatiche rilevate, viene riportata dal software e può essere utilizzata per stimare la frazione tumorale.

La valutazione di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System ha considerato il rilevamento di varianti a singolo nucleotide (SNV, Single-Nucleotide Variant), delezioni e inserzioni. La concordanza tra le piattaforme è risultata elevata per tutti i tipi di varianti, a dimostrazione della coerenza delle prestazioni del saggio (Figura 4 e Figura 5).

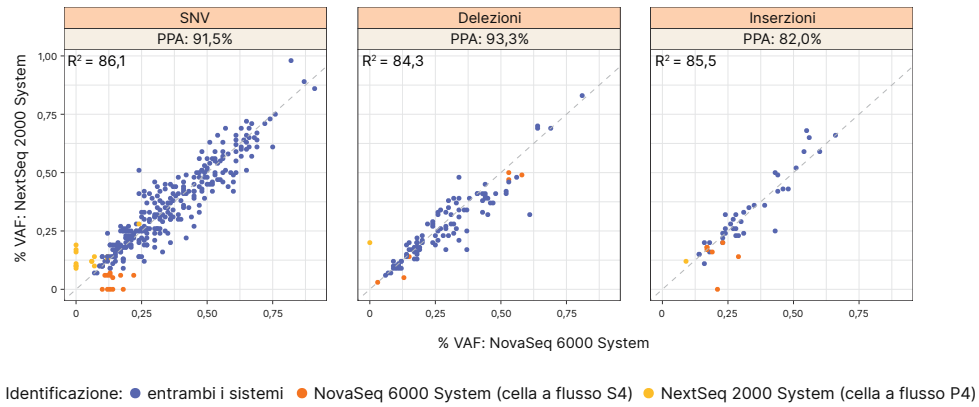


Figura 4: forte concordanza per più tipi di varianti

Le librerie di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (miscela di linee cellulari, Seraseq e campioni di plasma) sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. I risultati hanno dimostrato elevata concordanza della frequenza allelica delle varianti (VAF, Variant Allele Frequency) nel rilevamento di varianti a singolo nucleotide (SNV, Single-Nucleotide Variant), delezioni e inserzioni.

PPA (Positive Percent Agreement), percentuale di concordanza positiva.

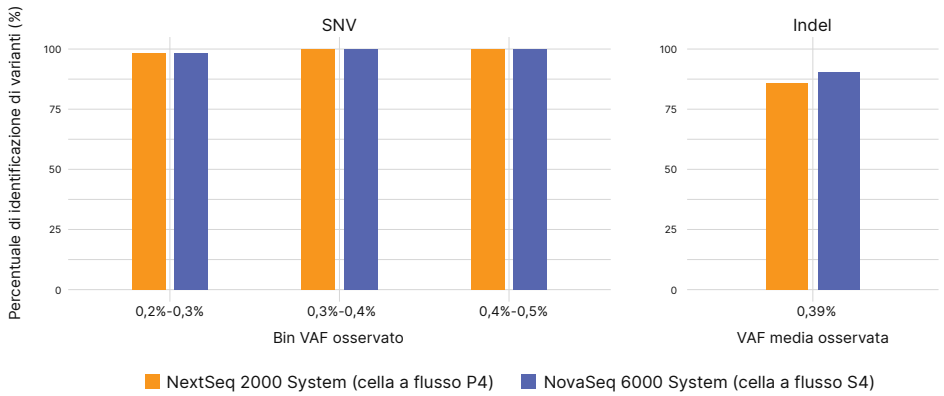


Figura 5: elevata concordanza nell'identificazione di varianti piccole

Il rilevamento di varianti piccole è stato valutato in campioni di controllo Seraseq. Una percentuale di identificazione del 100% indica che sono state rilevate tutte le varianti previste. Le percentuali di identificazione dei diversi tipi di varianti con NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System sono risultate altamente concordanti.

Indel, inserzioni e delezioni; SNV (Single Nucleotide Variant), variante a singolo nucleotide; VAF (Variant Allele Frequency), frequenza allelica delle varianti.

Rilevamento di CNV

Le variazioni del numero di copie hanno un ruolo fondamentale nell'insorgenza, nella progressione e nella resistenza ai trattamenti del cancro.[11] Il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA identifica le CNV mediante un pannello dei parametri normali (un pannello di riferimento derivato da campioni senza alterazioni somatiche note) e campioni artificiali per tenere conto di distorsioni e artefatti tecnici. Un'ulteriore fase di correzione delle distorsioni GC mitiga la variabilità della copertura associata al contenuto GC per migliorare l'accuratezza dell'identificazione di CNV.

Le prestazioni del saggio nel rilevamento di delezioni e amplificazioni geniche sono state valutate con le diverse miscele di linee cellulari e un campione di controllo Seraseq mediante misurazioni della variazione. I dati ottenuti con NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System sono risultati altamente concordanti sia per gli eventi di amplificazione sia per quelli di delezione (Figura 6 e Tabella 5). L'utilizzo di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq 2000 System consente l'identificazione con limite di rilevamento pari o superiore a 1,3 volte per le amplificazioni e pari o inferiore a 0,6 per le delezioni (Tabella 5).

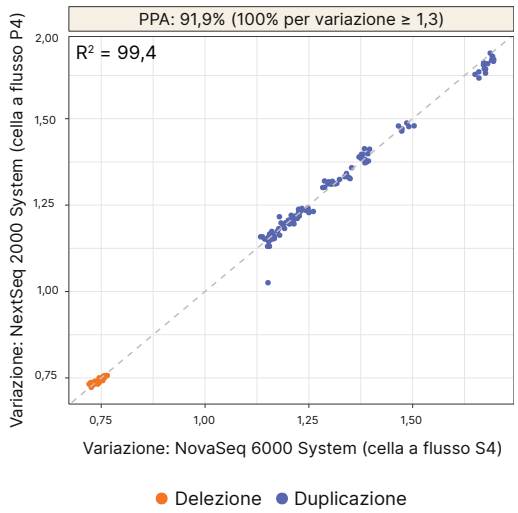


Figura 6: concordanza delle misurazioni della variazione per l'analisi delle CNV
Le librerie di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (miscela di linee cellulari e Seraseq) sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. I valori di variazione, utilizzati per valutare le varianti del numero di copie (CNV, Copy Number Variant) nei diversi geni, sono risultati fortemente concordanti sulle due piattaforme, confermando il rilevamento affidabile delle CNV.
PPA (Positive Percent Agreement), percentuale di concordanza positiva.

Tabella 5: confronto delle prestazioni analitiche di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 per le CNV

Tipo di campione	Variazione	
	NovaSeq 6000 System (cella a flusso S4)	NextSeq 2000 System (cella a flusso P4)
Miscele di linee cellulari a tre diluizioni (Tabella 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, puro (0,5% di VAF)		
ERBB2	1,300	1,312
MET	1,384	1,391
MYC	1,211	1,207

I campioni con varianti del numero di copie sono stati valutati utilizzando TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. Le amplificazioni sono state valutate con lo standard di riferimento Seraseq ctDNA allo 0,5% di VAF e miscele di linee cellulari a tre diluizioni; le delezioni sono state valutate con miscele di linee cellulari. È stato definito un limite di rilevamento (LOD, Limit Of Detection) pari o superiore a 1,3 per le amplificazioni e pari o inferiore a 0,6 per le delezioni. I valori mostrati sono le variazioni medie relative a sei replicati.

Rilevamento di riarrangiamenti genici

I riarrangiamenti genici sono varianti complesse che richiedono un rilevamento affidabile ai fini della CGP.[12] Il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA identifica i riarrangiamenti genici mediante l'analisi basata su grafi delle evidenze di varianti strutturali, incluse letture split e spanning. I dati vengono quindi elaborati attraverso una serie di fasi analitiche e di filtraggio, compresa la deduplicazione basata su UMI, per perfezionare le identificazioni di varianti. Le letture di supporto forniscono evidenze dirette dei breakpoint di riarrangiamento e aiutano a distinguere gli eventi reali dagli artefatti di sequenziamento.

Il rilevamento delle fusioni con TruSight Oncology 500 ctDNA v2 è risultato altamente concordante su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System (Figura 7 e Tabella 6).

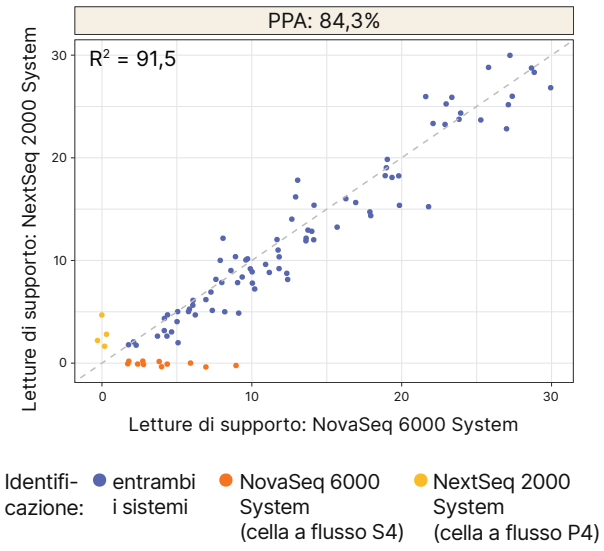


Figura 7: elevata concordanza nel rilevamento di fusioni del DNA

Le librerie di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (miscela di linee cellulari e Seraseq) sequenziate su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System hanno mostrato elevata concordanza nel rilevamento di fusioni del DNA.
PPA (Positive Percent Agreement), percentuale di concordanza positiva.

Tabella 6: prestazioni analitiche per i riarrangiamenti genici

Tipo di campione	Gene	Livello di diluizione	Frequenza allelica delle varianti (VAF) media	
			NovaSeq 6000 System	NextSeq 2000 System
Miscela di linee cellulari	*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*	Puro	0,35%	0,33%
	EML4-ALK	Puro	0,32%	0,31%
	NCOA4-RET	Puro	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%

Le miscele di linee cellulari sono state valutate a tre livelli di diluizione, mentre lo standard di riferimento Seraseq cfDNA è stato analizzato puro (AF allo 0,5%) e a due livelli di diluizione (Tabella 3) utilizzando TruSight Oncology 500 ctDNA v2; il sequenziamento è stato eseguito su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. I valori rappresentano la media di sei replicati tecnici di un unico livello di diluizione.

Firme IO: rilevamento di bMSI e bTMB

L'analisi delle firme IO con TruSight Oncology 500 ctDNA v2 include la valutazione della bMSI e del bTMB. La bMSI riflette i difetti nei percorsi di riparazione dei mismatch del DNA e funge da marker di instabilità dell'intero genoma.[13] Il bTMB cattura il numero complessivo di mutazioni somatiche nelle regioni codificanti e fornisce una misura quantitativa del carico mutazionale.[1]

Lo stato bMSI viene dedotto dalla variabilità su più loci genomici, utilizzando la divergenza di Jensen-Shannon (sumJSD) come metrica di valutazione. L'analisi su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System ha mostrato elevata concordanza nella stima dello stato bMSI (Figura 8).

La stima affidabile del bTMB richiede pannelli di sequenziamento che coprano almeno 1,1 Mb di sequenza codificante.[14,15] TruSight Oncology 500 ctDNA v2 copre circa 1,3 Mb, consentendo il calcolo del bTMB nel cfDNA. I risultati relativi alla stima del bTMB su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System in campioni artificiali e di plasma si sono dimostrati concordanti (Figura 9).

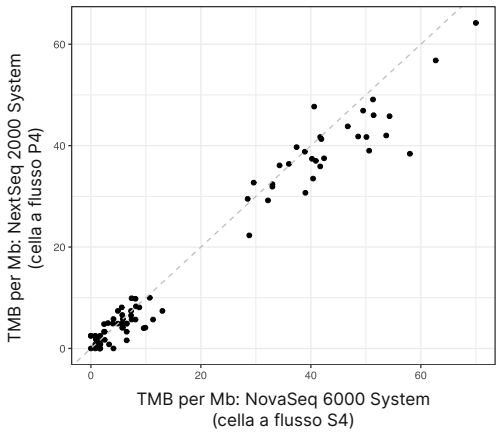


Figura 9: elevata concordanza dell'analisi del bTMB
Le librerie di TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (miscela di linee cellulari, Seraseq e campioni clinici) sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. Il carico mutazionale del tumore basato sul sangue (bTMB, blood-based Tumor Mutational Burden) è stato misurato con il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.6.

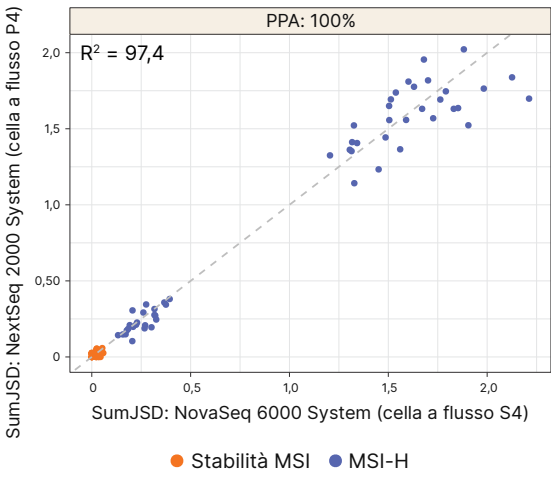


Figura 8: concordanza dello stato bMSI
I campioni di controllo Seraseq, le miscele di linee cellulari e i campioni di plasma sono stati preparati con TruSight Oncology 500 ctDNA v2 e analizzati su NovaSeq 6000 System e NextSeq 2000 System. La sensibilità analitica per lo stato di instabilità microsatellitare (MSI, Microsatellite Instability) è stata misurata con il software di analisi DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.6. I dati indicano risultati altamente concordanti sui due sistemi.
MSI-H (Microsatellite Instability-High), instabilità microsatellitare elevata; PPA (Positive Percent Agreement), percentuale di concordanza positiva.

Riepilogo

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 consente la ricerca CGP sul ctDNA grazie alla capacità di rilevare più classi di varianti e firme genomiche a partire da un prelievo di sangue minimamente invasivo. NextSeq 2000 System è una soluzione di sequenziamento da banco, basata sulla chimica XLEAP-SBS e sulla gestione semplificata dei reagenti, in grado di fornire dati di alta qualità. Implementando TruSight Oncology 500 ctDNA v2 su NextSeq 2000 System, i laboratori possono contare su un saggio conveniente e altamente sensibile, nonché su un flusso di lavoro semplificato della durata di tre giorni con analisi completamente automatizzata.[2]

La concordanza dei dati con NovaSeq 6000 System è stata dimostrata per tutte le principali classi di varianti, tra cui varianti piccole, CNV, riarrangiamenti genici e firme IO bMSI e bTMB. NextSeq 2000 System non è compatibile soltanto con TruSight Oncology 500 ctDNA v2, ma anche con TruSight Oncology 500, la soluzione Illumina per la ricerca CGP basata su tessuto, pertanto i laboratori possono contare sulla flessibilità necessaria per diversi flussi di lavoro.

Maggiori informazioni →

TruSight Oncology 500 ctDNA v2

NovaSeq 6000 System

NextSeq 2000 System

Bibliografia

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. Scheda tecnica di TruSight Oncology 500 ctDNA v2. 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. Pubblicata nel 2025. Consultata il 23 settembre 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. Pubblicato nel 2022. Consultato il 23 settembre 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. Pubblicato nel 2024. Consultato il 5 dicembre 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. Dati in archivio. Illumina, Inc. 2025.
8. Scheda tecnica di NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System. 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. Pubblicata nel 2025. Consultata il 23 settembre 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. Pubblicato nel 2025. Consultato il 12 dicembre 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®

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

© 2026 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-03798 ITA v1.0