Verwendung von cfDNA als Zugabe für TruSight™ Oncology 500 v2

Eine Lösung für FFPE- und cfDNA-Proben

Ein Workflow

Integration von cfDNA in vorhandene FFPE-Workflows, statt Anschaffung einer separaten Liquid-Biopsy-Lösung

Höhere Effizienz

Optimierung von Abläufen im Labor zur Minimierung von Fehlern und zur Verkürzung der Durchlaufzeiten

Breiterer Umfang

Erweiterung der CGP-Forschungsanwendungen um cfDNA, was umfassendere und flexiblere Studien ermöglicht

Einleitung

Anhand von umfassendem genomischen Profiling (CGP, Comprehensive Genomic Profiling) mit gezielter NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) können in der onkologischen Forschung tätige Labore DNA-Varianten sowohl in solidem Tumorgewebe als auch in Liquid-Biopsy-Proben charakterisieren.[1–3] TruSight Oncology 500 v2 ist ein Hybrid-Capture-Assay, der für das CGP einer Zugabe aus formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter DNA und RNA vorgesehen ist und die Erforschung wichtiger Variantenklassen ermöglicht, darunter kleine DNA-Varianten, Kopienzahländerungen und Genfusionen. Der Assay ermöglicht zudem die Beurteilung der Immunonkologie(IO)-Signaturen, Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Tumormutationslast (TMB, Tumor Mutational Burden) sowie die Untersuchung der homologen Rekombinationsdefizienz (HRD).[4] Bei TruSight Oncology 500 ctDNA v2 handelt es sich um eine separate Workflow-Lösung, die CGP-Forschung anhand zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA, circulating tumor DNA) ermöglicht und eine breite Coverage tumorspezifischer Veränderungen sowie die Beurteilung von blutbasierter TMB (bTMB) und blutbasierter MSI (bMSI) ermöglicht.[5]

Labore, die anhand von TruSight Oncology 500 v2 Gewebeprofile erstellen, möchten ihre Forschungskapazitäten unter Umständen um die ctDNA-Analyse erweitern. Die Einführung eines separaten Assays und Workflows für ctDNA erfordert jedoch zusätzliche Schulungen, schränkt die Flexibilität bei der Zusammenstellung von Batches ein und kann zu Abweichungen bei der Handhabung führen. Ein Bibliotheksvorbereitungsworkflow, der sich sowohl für die Zugabe von FFPE-DNA/-RNA als auch von cfDNA eignet, kann zur Optimierung der Abläufe im Labor beitragen, den Durchsatz erhöhen und größere Flexibilität bei der Verarbeitung und Sequenzierung von Proben ermöglichen. Obwohl es sich bei TruSight Oncology 500 v2 und TruSight Oncology 500 ctDNA v2 um für unterschiedliche Zugabetypen entwickelte Assays handelt, sind die Bibliotheksvorbereitungs- und Anreicherungsworkflows extrem ähnlich[4,5], was Laboren, die einen konsistenten Workflow anstreben, die Auswertung von Zugaben zellfreier DNA (cfDNA, cell-free DNA) im gewünschten Workflow für TruSight Oncology 500 v2 ermöglicht.

Im vorliegenden technischen Hinweis wird die Eignung von cfDNA als Zugabe beim TruSight Oncology 500 v2-Workflow im Rahmen einer kleinen Proof-of-Concept-Studie erörtert und die Performance im Vergleich zum Workflow für TruSight Oncology 500 ctDNA v2 bewertet. Wichtigste Metriken sind Coverage, analytische Sensitivität und analytische Spezifität in Bezug auf Variantenklassen, bMSI und bTMB, wobei aus Plasma gewonnene cfDNA und eine Referenzkontrollprobe mit DRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA-Analyse ausgewertet wurden.* Aus den Studienergebnissen geht hervor, dass der Assay TruSight Oncology 500 v2 für die Zugabe von cfDNA geeignet ist, sodass Labore auch Liquid-Biopsy-Proben untersuchen können und zugleich von einem konsistenten Bibliotheksvorbereitungsprozess profitieren.

* Es wurde keine HRD-Analyse durchgeführt, da Signaturen von Genomnarben bei cfDNA mit geringer Tumorfraktion nicht zuverlässig messbar sind.[6]

Methoden

Proben

Anonymisierte Plasmaproben wurden im Handel erworben, darunter sieben Proben von normalen Spendern (Proben 1–7) und vier Proben von Krebspatienten (Proben 8–11). Zirkulierende cfDNA wurde gemäß Herstelleranweisungen mit dem QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 55114) extrahiert. Zusätzlich wurde eine mit dem Referenzstandard Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF0.5% (SeraCare, Katalog-Nr. 0710-0531) vorbereitete Probe in die Studie aufgenommen (Probe 12).

Die extrahierten cfDNA-Proben wurden mit einem 5300 Fragment Analyzer (Agilent, Katalog-Nr. M5311AA) mit dem HS Large Fragment 50 kb Kit (Agilent, Katalog-Nr. DNF-464-0500) quantifiziert. Die Referenzkontrollprobe Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix wurde auf dem Agilent 4200 TapeStation-System (Agilent, Katalog-Nr. G2991BA) mit dem Cell-free DNA ScreenTape (Agilent, Katalog-Nr. 5067-5630) und Cell-free DNA Reagents (Agilent, Katalog-Nr. 5067-5631) quantifiziert. Die Optimierung der cfDNA-Quantifizierung wird im technischen Hinweis „Accurate quantification of cfDNA for use in TruSight Oncology 500 ctDNA“ (Genaue Quantifizierung von cfDNA zur Verwendung mit TruSight Oncology 500 ctDNA) erläutert.

Bibliotheksvorbereitung und -sequenzierung

Zum Test der Performance des Assays TruSight Oncology 500 v2 mit cfDNA wurden Bibliotheken gemäß der Produktdokumentation zu TruSight Oncology 500 v2 bei direkter Zugabe von cfDNA vorbereitet. Sämtliche Schritte der Bibliotheksvorbereitung, Anreicherung und Indexierung erfolgten manuell (ausgenommen des ausgelassenen Fragmentierungsschritts). Stattdessen wurden cfDNA-Proben entsprechend dem TruSight Oncology 500 v2-Protokoll in einem Gesamtvolumen von 50 µl auf Zugabemengen von 5 ng bzw. 20 ng verdünnt.

Zum Vergleich wurden Bibliotheken für die gleichen Proben mit TruSight Oncology 500 ctDNA v2 mit einer cfDNA-Zugabe gemäß der Produktdokumentation zu TruSight Oncology 500 ctDNA v2 vorbereitet. Sämtliche Schritte der Bibliotheksvorbereitung, Anreicherung und Indexierung erfolgten manuell und gemäß dem Protokoll.

Vorbereitete Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq™ 6000Dx Sequencing System† anhand von Paired-End-Reads mit 151 bp und doppelten 10-bp-Indizes auf einer S4-Fließzelle sequenziert.

† Das NovaSeq 6000Dx Sequencing System wurde im RUO-Modus betrieben.

Datenanalyse

Die Sequenzierungsdaten wurden mit der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software v2.1 analysiert. Qualitätssicherung- und Performancemetriken, einschließlich solcher für die Coverage und den Variantennachweis, wurden anhand von Standardanalyseausgaben ausgewertet. Da für den ctDNA-Workflow kein TruSight Oncology 500 v2-spezifisches Ressourcenpaket zur Verfügung steht, wurde die Analyse unter Verwendung von ctDNA-Workflowressourcendateien (z. B. systemisches Rauschen und CNV-Normalpanel) durchgeführt.

Ergebnisse

Performance bezüglich QC-Metriken

Für alle zwölf mit TruSight Oncology 500 v2 vorbereiteten Proben wurden zur Bewertung von Tiefe und Einheitlichkeit der Coverage Qualitätssicherungsmetriken (QC, Quality Control) untersucht.

Die mediane Exon-Coverage bei den zwölf Proben und einer Zugabe von 20 ng deutet auf eine konsistente Sequenzierungsperformance hin. Die untere Spezifikationsgrenze (LSL, Lower Specification Limit) wurde bei allen Proben überschritten (Abbildung 1).

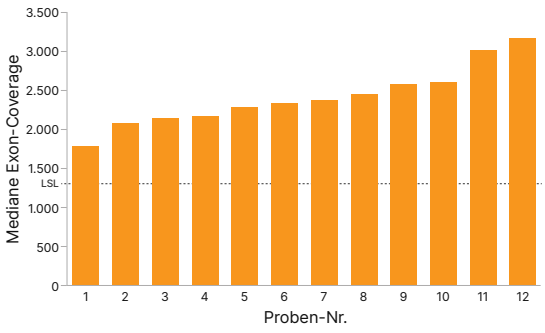


Abbildung 1: Mediane Exon-Coverage bei cfDNA-Proben, beurteilt mit TruSight Oncology 500 v2
Dargestellt wird die mediane Exon-Coverage für 12 eindeutige Proben, die mit einer Zugabe von 20 ng vorbereitet und mit TruSight Oncology 500 v2 verarbeitet wurden, einschließlich cfDNA aus Plasma normaler Spender (Proben-Nr. 1–7) und von Krebspatienten (Proben-Nr. 8–11) sowie einer für Forschungszwecke erstellten ctDNA-Referenzprobe (Proben-Nr. 12). Bei sämtlichen Proben wurde die untere Spezifikationsgrenze (LSL) des Assays überschritten, woraus sich ableiten lässt, dass die Sequenzierungsperformance bei den untersuchten Proben konsistent ist.

Die Einheitlichkeit der Coverage wurde anhand des Prozentsatzes der Exons mit mindestens 1.000-facher Coverage beurteilt. Bei allen Proben zeigte sich eine hohe Coverage auf Exonebene, woraus sich ableiten lässt, dass die Tiefe ausreichend für nachgeschaltete Analysen zum Variantennachweis ist (Abbildung 2).

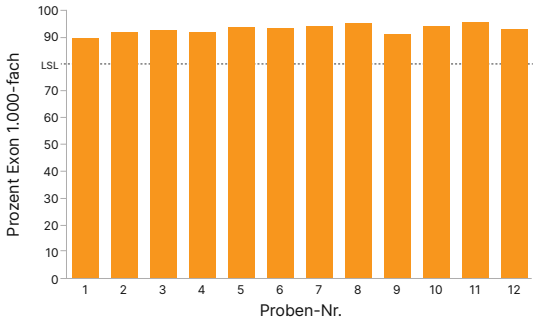


Abbildung 2: Exon-Coverage ≥ 1.000-fach bei cfDNA-Proben, beurteilt mit TruSight Oncology 500 v2
Die Einheitlichkeit der Coverage wurde als Prozentsatz der Exons mit mindestens 1.000-facher Coverage bei allen 12 Proben bewertet, die mit einer Zugabe von 20 ng vorbereitet und mit TruSight Oncology 500 v2 verarbeitet wurden. Die Exon-Coverage war bei allen Proben hoch und lag über der unteren Spezifikationsgrenze (LSL) des Assays, womit die Sequenzierungstiefe ausreichend für nachgeschaltete Analysen zum Nachweis von Varianten ist.

Analytische Spezifität und Sensitivität

Analytische Spezifität bezüglich cfDNA-Normalproben

Bei sämtlichen Variantenklassen, Assays und DNA-Zugabemengen zeigte sich eine hohe analytische Spezifität. Sowohl bei TruSight Oncology 500 v2 als auch bei TruSight Oncology 500 ctDNA v2 betrug die analytische Spezifität für kleine DNA-Varianten, Genamplifikationen, Gendeletionen, Genrearrangements und den Status der Mikrosatelliteninstabilität 100 % bzw. > 99,999 % sowohl bei einer Zugabe von 5 ng als auch bei Zugabe von 20 ng (Tabelle 1).

Die analytische Spezifität bezüglich kleiner DNA-Varianten in cfDNA-Normalproben war über einzelne Proben hinweg hoch, wobei die analytische Spezifität insgesamt für alle Assay-Zugabe-Kombinationen bei über 99,99 % lag (Tabelle 2). Die analytische Spezifität bezüglich der Genamplifikation betrug 100 % für alle ausgewerteten Proben, Zugaben und Assays, wobei keine falsch positiven Ergebnisse zu verzeichnen waren (Tabelle 3). In ähnlicher Weise zeigte sich beim Fusionsnachweis eine analytische Spezifität von 100 % bei allen cfDNA-Normalproben für beide Assays und beide Zugabemengen (Tabelle 4).

Tabelle 1: Analytische Spezifität, analytische Sensitivität und Baseline-Performance bezüglich der IO-Gensignaturen für TruSight Oncology 500 v2 und TruSight Oncology 500 ctDNA v2 in einer kleinen Studie

cfDNA-Zugabe	Variantenklasse	TruSight Oncology 500 v2		TruSight Oncology 500 ctDNA v2	
		5 ng	20 ng	5 ng	20 ng
Analytische Spezifität (n = 7)[a]	SNVs	> 99,999 %	> 99,999 %	> 99,992 %	> 99,999 %
	Genamplifikationen	100 %	100 %	100 %	100 %
	Gendeletionen	100 %	100 %	100 %	100 %
	Genrearrangements	100 %	100 %	100 %	100 %
	bMSI-Status	100 %	100 %	100 %	100 %
Analytische Sensitivität (n = 1)[b]	SNVs bei 0,5 %	89,5 %	100 %	57,9 %	95 %
	Genamplifikationen	100 %	66,7 %	100 %	66,7 %
	Genrearrangements	66,7 %	100 %	33 %	100 %
IO-Gensignaturen – Baseline-Performance (n = 7)[c]	bMSI – SumJSD-Durchschnitt	0,003	0,012	0,002	0,019
	bTMB-Score – Durchschnitt	1,79	1,91	0,68	2,12

a. Die Ergebnisse der Analyse der analytischen Spezifität wurden anhand von sieben cfDNA-Normalproben ermittelt.
b. Die Ergebnisse der Analyse der analytischen Sensitivität wurden anhand einer zu Forschungszwecken erstellten Kontrollprobe (Seraseq cfDNA complete mutation mix AF0.5%) ermittelt.
c. Die Baseline-Performance bezüglich der IO-Gensignaturen wurde anhand von sieben cfDNA-Normalproben ermittelt.
bMSI: blutbasierte Mikrosatelliteninstabilität; bTMB: blood-based Tumor Mutational Burden (blutbasierte Tumormutationslast); IO: Immunonkologie; VAF: Variantenallelfrequenz.

Tabelle 2: Analytische Spezifität bezüglich kleiner DNA-Varianten in cfDNA-Normalproben

Proben-Nr.	TruSight Oncology 500 v2				TruSight Oncology 500 ctDNA v2			
	5 ng		20 ng		5 ng		20 ng	
	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität
1	0	100 %	4	99,9998 %	2	99,998 %	4	99,9998 %
2	nicht verfügbar	nicht verfügbar	15	99,9992 %	6	98,4887 %	10	99,9992 %
3	0	100 %	2	99,9999 %	4	99,9053 %	1	99,9999 %
4	9	99,9982 %	12	99,9993 %	8	99,9972 %	5	99,9997 %
5	0	100 %	0	100 %	1	99,505 %	1	99,9999 %
6	3	99,9996 %	5	99,9997 %	3	98,3607 %	2	99,9998 %
7	2	99,9997 %	5	99,9997 %	4	99,1323 %	2	99,9998 %
Analytische Spezifität (gesamt)	14	> 99,9996 %	43	> 99,9997 %	28	> 99,9928 %	25	> 99,9998 %

FP: falsch positiv.

Tabelle 3: Analytische Spezifität bezüglich Genamplifikationen bei cfDNA-Normalproben

Proben-Nr.	TruSight Oncology 500 v2				TruSight Oncology 500 ctDNA v2			
	5 ng		20 ng		5 ng		20 ng	
	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität
1	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
2	nicht verfügbar	nicht verfügbar	0	100 %	0	100 %	0	100 %
3	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
4	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
5	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
6	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
7	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
Analytische Spezifität (gesamt)	n. z.	100 %	n. z.	100 %	n. z.	100 %	n. z.	100 %

FP: falsch positiv; n. z.: nicht zutreffend.

Tabelle 4: Analytische Spezifität bezüglich Fusionen in cfDNA-Normalproben

Proben-Nr.	TruSight Oncology 500 v2				TruSight Oncology 500 ctDNA v2			
	5 ng		20 ng		5 ng		20 ng	
	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität	FP (gesamt)	Analytische Spezifität
1	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
2	nicht verfügbar	nicht verfügbar	0	100 %	0	100 %	0	100 %
3	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
4	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
5	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
6	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
7	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %
Analytische Spezifität (gesamt)	n. z.	100 %	n. z.	100 %	n. z.	100 %	n. z.	100 %

FP: falsch positiv; n. z.: nicht zutreffend.

Analytische Sensitivität bei der für Forschungszwecke erstellen Referenzprobe

Die analytische Sensitivität der Assays TruSight Oncology 500 v2 und TruSight Oncology 500 ctDNA v2 bei Zugabe von cfDNA wurde in einer kleinen Studie mit einem einzelnen Replikat der Referenzstandardprobe Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix bewertet.

Die analytische Sensitivität beim Nachweis kleiner DNA-Varianten wurde anhand von 19 bekannten Varianten mit einer VAF von ca. 0,5 % ermittelt. Die analytische Sensitivität erhöhte sich mit DNA-Zugabe und erreichte für TruSight Oncology 500 v2 bei 20 ng 100 % (Tabelle 1 und Tabelle 5).

Die analytische Sensitivität des Genamplifikationsnachweises wurde anhand einer für Forschungszwecke erstellten Referenzprobe mit drei erwarteten Amplifikationen bewertet. Alle Amplifikationen wurden bei der Zugabe von 5 ng nachgewiesen, während bei der Zugabe von 20 ng für beide Assays zwei von drei nachgewiesen wurden (Tabelle 6).

Die analytische Sensitivität bezüglich des Fusionsnachweises wurde für drei erwartete Fusionen in der für Forschungszwecke erstellen Referenzprobe bewertet. Alle Fusionen wurden bei Zugabe von 20 ng nachgewiesen. Bei Zugabe von 5 ng war die analytische Sensitivität geringer (Tabelle 7).

Tabelle 5: Analytische Sensitivität bezüglich kleiner DNA-Varianten in einer kleineren Studie mit einer Referenzprobe (n = 1)

Gen	Variante	TruSight Oncology 500 v2		TruSight Oncology 500 ctDNA v2	
		Nachweisrate		Nachweisrate	
		5 ng	20 ng	5 ng	20 ng
AKT1	E17K	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
ALK	F1174L	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
ALK	G120R	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
BRAF	V600E	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
BRCA1	K65FS*47	0 % (0/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	0 % (0/1)
BRCA2	R2645FS*3	0 % (0/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
EGFR	E746_A750del ELREA	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
EGFR	L747	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
EGFR	L858R	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
EGFR	S752_I759 del SPKANKEI	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
EGFR	T790M	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
ERBB2	A775_G776 ins YVMA	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
KIT	D816V	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
KRAS	G12C	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
KRAS	G12D	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
KRAS	Q61H	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	100 % (1/1)
NRAS	Q61R	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
PIK3CA	H1047R	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
PIK3CA	N1068fs*4	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
Analytische Sensitivität (gesamt)		89,5 % (17/19)	100 % (19/19)	57,9 % (11/19)	95 % (18/19)

Tabelle 6: Analytische Sensitivität bezüglich Genamplifikationen in einer kleineren Studie mit einer Referenzprobe (n = 1)

Gen	Erwartete x-fache Änderung	TruSight Oncology 500 v2				TruSight Oncology 500 ctDNA v2			
		5 ng		20 ng		5 ng		20 ng	
		Beobachtete x-fache Änderung	Nachweis-rate	Beobachtete x-fache Änderung	Nachweis-rate	Beobachtete x-fache Änderung	Nachweis-rate	Beobachtete x-fache Änderung	Nachweis-rate
ERBB2	1,28	1,31	100 % (1/1)	1,32	100 % (1/1)	1,32	100 % (1/1)	1,31	100 % (1/1)
MET	1,20	1,38	100 % (1/1)	1,44	100 % (1/1)	1,40	100 % (1/1)	1,42	100 % (1/1)
MYC	1,18	1,19	100 % (1/1)	nicht nachgewiesen	0 % (0/1)	1,21	100 % (1/1)	nicht nachgewiesen	0 % (0/1)
Analytische Sensitivität (gesamt)	n. z.	n. z.	100 % (3/3)	n. z.	66,7 % (2/3)	n. z.	100 % (3/3)	n. z.	66,7 % (2/3)

n. z.: nicht zutreffend

Tabelle 7: Analytische Sensitivität bezüglich DNA-Fusionen in einer kleineren Studie mit einer Referenzprobe (n = 1)

Fusion	Erwartete VAF[a]	TruSight Oncology 500 v2						TruSight Oncology 500 ctDNA v2					
		5 ng			20 ng			5 ng			20 ng		
		Beobachtet		Nachweis-rate	Beobachtet		Nachweis-rate	Beobachtet		Nachweis-rate	Beobachtet		Nachweis-rate
		VAF	Tiefe		VAF	Tiefe		VAF	Tiefe		VAF	Tiefe	
ALK-EML4	0,49	0,55 %	1.266	100 % (1/1)	0,32 %	3.789	100 % (1/1)	nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen	0 % (0/1)	0,28 %	2.859	100 % (1/1)
RET-NCOA4	0,56	nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen	0 % (0/1)	0,26 %	3.119	100 % (1/1)	nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen	0 % (0/1)	0,13 %	2.363	100 % (1/1)
ROS1-CD74	0,53	0,23 %	1.281	100 % (1/1)	0,30 %	3.617	100 % (1/1)	0,45 %	892	100 % (1/1)	0,33 %	3.617	100 % (1/1)
Analytische Sensitivität (gesamt)	n. z.	n. z.	n. z.	66,7 % (2/3)	n. z.	n. z.	100 % (3/3)	n. z.	n. z.	33,3 % (1/3)	n. z.	n. z.	100 % (3/3)

a. Erwartete VAF als durchschnittliche AF anhand digitaler PCR (Daten von SeraCare).
VAF: Variantenallelfrequenz; n. z.: nicht zutreffend.

IO-Gensignaturen – Baseline-Performance

Die Beurteilung der Immunonkologie(IO)-Signaturen mit TruSight Oncology 500 ctDNA v2 umfasst die Bestimmung von bMSI und bTMB. bMSI spiegelt Defekte in den DNA-Mismatch-Reparatursignalwegen wider und wird aus der anhand mehrerer Genomloci ermittelten Variabilität abgeleitet, wobei die Jensen-Shannon-Divergenz (SumJSD) als Auswertungsmetrik verwendet wird.[7] Der bTMB-Score gibt die Anzahl somatischer Mutationen innerhalb der Codierungsregionen an und liefert ein quantitatives Maß für die Mutationslast.[8]

Die bMSI-Performance wurde für cfDNA-Normalproben mit Zugaben von 5 ng und 20 ng bewertet, die mit TruSight Oncology 500 v2 und TruSight Oncology 500 ctDNA v2 verarbeitet wurden. Bei sämtlichen Proben zeigten sich niedrige SumJSD-Werte unterhalb des bMSI-high-Schwellenwerts, was der erwarteten Mikrosatellitenstabilität bei Normalproben entspricht (Abbildung 3 und Tabelle 1).

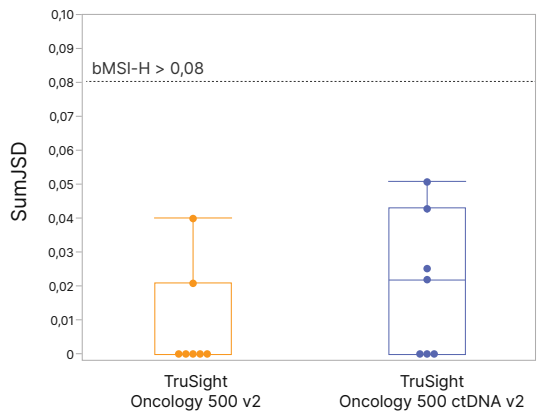


Abbildung 3: Vergleich der bMSI-Beurteilung mithilfe der SumJSD
Die bMSI wurde anhand der SumJSD-Metrik für sieben cfDNA-Normalproben beurteilt, die mit dem Workflow für TruSight Oncology 500 v2 und dem Workflow für TruSight Oncology 500 ctDNA v2 verarbeitet wurden. Die Balken stellen aggregierte SumJSD-Werte für die einzelnen Workflows dar. Bei allen Proben lagen die SumJSD-Werte unterhalb des bMSI-high-Schwellenwerts.

Die bTMB-Performance wurde für mit TruSight Oncology 500 v2 und TruSight Oncology 500 ctDNA v2 verarbeitete Proben beurteilt. Die bTMB-Scores im Zusammenhang mit cfDNA-Normalproben sowohl bei einer Zugabe von 5 ng als auch von 20 ng waren niedrig, mit konsistenten Werten bei allen Workflows und Zugabemengen (Abbildung 4 und Tabelle 1). Diese Ergebnisse weisen auf eine stabile Schätzung der Metriken bMSI und bTMB bei der Verwendung von cfDNA als Zugabe im Workflow für TruSight Oncology 500 v2 hin.

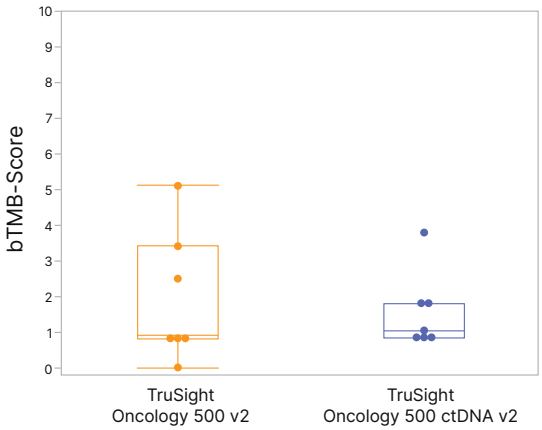


Abbildung 4: Vergleich der bTMB-Beurteilung
Die bTMB wurde anhand des bTMB-Scores für sieben cfDNA-Normalproben beurteilt, die mit dem Workflow für TruSight Oncology 500 v2 und dem Workflow für TruSight Oncology 500 ctDNA v2 verarbeitet wurden. Die Balken stellen aggregierte bTMB-Scores für die einzelnen Workflows dar. Die bTMB-Scores waren bei beiden Workflows niedrig.

Zusammenfassung

In dieser kleinen Proof-of-Concept-Studie wurde die Eignung von cfDNA als Zugabe im Rahmen des Workflows für TruSight Oncology 500 v2 bei Zugabemengen von 5 ng und 20 ng untersucht und die Performance im Vergleich zu TruSight Oncology 500 ctDNA v2 bewertet. TruSight Oncology 500 v2 erfüllte bei einer Zugabemenge von 20 ng die Qualitätssicherungsspezifikationen des Assays bei konsistenter Tiefe und Einheitlichkeit der Coverage bei allen cfDNA-Proben. Die analytische Spezifität bei cfDNA-Normalproben lag für kleine DNA-Varianten bei über 99,99 %. Die analytische Sensitivität bezüglich seltener Varianten im ctDNA-Referenzmaterial von Seraseq war abhängig von Variantenklasse und Zugabemenge. Bei beiden Assays war der Nachweis bei der Zugabe von 20 ng umfassender. Bei den ausgewerteten Metriken war die Performance von TruSight Oncology 500 v2 mit cfDNA-Zugabe vergleichbar mit der von TruSight Oncology 500 ctDNA v2, woraus sich ableiten lässt, dass sich der Workflow für TruSight Oncology 500 v2 für Liquid-Biopsy-Anwendungen in der Forschung eignet.

Weitere Informationen →

TruSight Oncology 500 v2

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA-Analyse

Quellen

1. Wallen ZD, Nesline MK, Tierno M, et al. Genomic profiling of NSCLC tumors with the TruSight Oncology 500 assay provides broad coverage of clinically actionable genomic alterations and detection of known and novel associations between genomic alterations, TMB, and PD-L1. *Front Oncol.* 2024;14. doi:10.3389/fonc.2024.1473327
2. 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
3. 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.
4. Illumina. TruSight Oncology 500 v2 data sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-v2-datasheet-m-gl-03460/tso500-v2-datasheet-m-gl-03460.pdf. Veröffentlicht 2025. Aufgerufen am 12. Februar 2026.
5. 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.
6. Liu R, Roberts E, Parsons HA, et al. DirectHRD enables sensitive scar-based classification of homologous recombination deficiency. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(8):gkaf313. doi:10.1093/nar/gkaf313
7. 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
8. 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

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-04095 DEU v1.0