

# TruSight™ Tumor 170

Completo ensayo de secuenciación de nueva generación que identifica variantes de ADN y ARN de la misma muestra tumoral fijada en formol y embebida en parafina (FFPE).

## Puntos destacados

- **Cobertura completa de variantes vinculadas al cáncer**  
Eficiencia de un solo ensayo que emplea ADN y ARN para evaluar variantes pequeñas, amplificaciones, variantes alternativas de corte y fusiones
- **Flujo de trabajo simplificado e integrado**  
Bibliotecas de ADN y ARN preparadas en paralelo a un flujo de trabajo integrado tras recorte de ADN/síntesis de ADNc
- **Resultados precisos a partir de muestras de baja calidad**  
Detección de variantes con una cantidad de entrada de 40 ng de ADN/ARN y frecuencia de alelos mutantes de tan solo el 5 % a partir de muestras FFPE

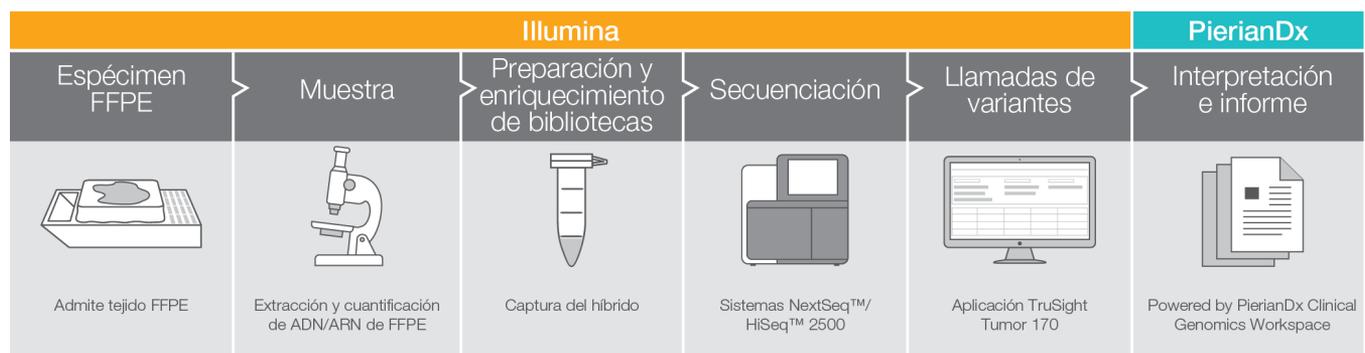
## Introducción

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo y es capaz de originarse en cualquier tejido.<sup>1</sup> Es importante analizar la base genética de un tumor determinado para comprender su progresión y desarrollar nuevos métodos de tratamiento. No obstante, numerosos genes pueden causar la progresión de un tumor o influir en ella, y muchos tumores heterogéneos portan varias mutaciones. Además, la función de cualquier gen puede verse alterada por diversos tipos de variaciones, como las variantes de nucleótido único (SNV), las variantes de nucleótido múltiple (MNV), las inserciones o deleciones pequeñas (indels), las amplificaciones, las variantes alternativas de corte o las fusiones de genes. Por lo tanto, los investigadores tienen dificultades para analizar tumores de forma eficaz cuando los métodos disponibles solo cubren parte de estas variaciones y los ensayos secuenciales consumen tejidos, tiempo y recursos muy valiosos.

Para ayudar a los investigadores a superar este problema, Illumina ofrece TruSight Tumor 170, un ensayo de secuenciación de próxima generación (NGS) diseñado para cubrir 170 genes asociados a tumores sólidos. TruSight Tumor 170 es un panel selectivo enriquecido que analiza simultáneamente ADN y ARN, y cubre una amplia gama de genes y tipos de variantes. El panel está diseñado para funcionar con los sistemas de secuenciación NextSeq™ 500, NextSeq 550 o HiSeq™ 2500 (figura 1).

## Diseño de contenido completo vinculado al cáncer

TruSight Tumor 170 identifica todos los exones de codificación en 170 genes de acuerdo con la base de datos RefSeq actual<sup>2</sup> (tabla 1). Los genes y el análisis de tipos de variantes para cada gen se han seleccionado meticulosamente para que incluyan el contenido que marcan algunos organismos profesionales, como la National Comprehensive Cancer Network (NCCN, red de centros oncológicos integrales de Estados Unidos) o la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, por sus siglas en inglés).<sup>3,4</sup> Las publicaciones de consorcios independientes y las investigaciones farmacéuticas en fase avanzada también han influido en el diseño de TruSight Tumor 170. El contenido lo conforman 55 genes de variantes de alternativas y fusiones, 148 variantes de nucleótidos únicos e inserciones y deleciones y 59 amplificaciones. Gracias a los conocimientos especializados de autoridades reconocidas dentro de la comunidad oncológica, TruSight Tumor 170 proporciona a los investigadores una cobertura completa de las variantes que presentan una mayor probabilidad de estar implicadas en la oncogénesis.



**Figura 1: Flujo de trabajo de TruSight Tumor 170.** TruSight Tumor 170 se ha optimizado para integrarse en los flujos de trabajo actuales de los laboratorios y se tarda menos de 4 días desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la llamada de variantes. El ensayo puede realizarse en los diferentes modelos de NextSeq o en el sistema HiSeq 2500.

Tabla 1: Contenido genético en el ensayo TruSight Tumor 170

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

## Flujo de trabajo combinado para ADN y ARN

La preparación de bibliotecas de TruSight Tumor 170 emplea un método de enriquecimiento que puede aplicarse simultáneamente al ADN y al ARN extraídos de la misma muestra. Después de los pasos iniciales, en los que el ADN genómico se recorta y el ARN se convierte en ADNc, la preparación de bibliotecas pasa a ser un flujo de trabajo combinado (figura 2).

- El ADN recortado y el ADNc se convierten en bibliotecas secuenciadas.
- Las regiones de interés se hibridan en sondas con biotina, se extraen por medios magnéticos con bolas recubiertas con estreptavidina y se eluyen para enriquecer la agrupación de bibliotecas.
- Las bibliotecas se normalizan mediante un protocolo basado en bolas antes de la agrupación y la secuenciación.

## Análisis de datos de TruSight Tumor 170

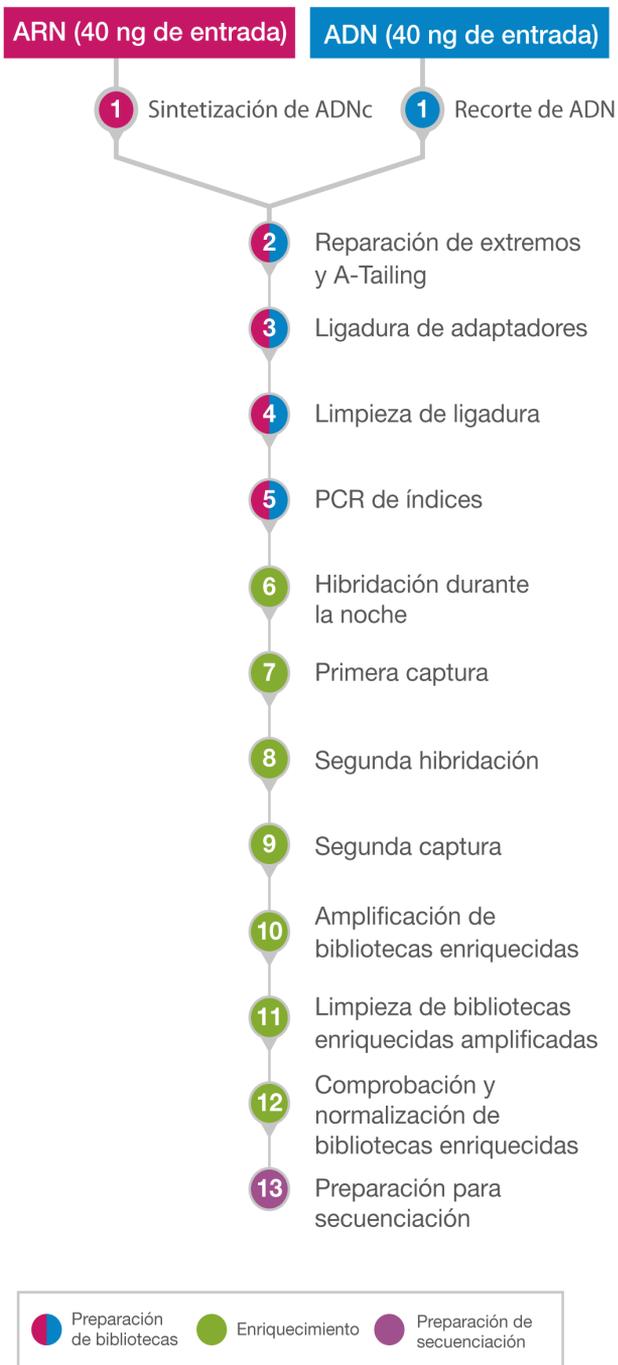
Los sistemas de secuenciación de Illumina ofrecen la opción de conectarse a BaseSpace® Sequence Hub, el entorno informático para genómica de Illumina, destinado a analizar y gestionar datos de secuenciación. Los investigadores pueden almacenar, analizar, archivar y compartir datos de secuenciación de forma segura.

La aplicación TruSight Tumor 170 se ha diseñado para realizar llamadas de variantes que permitan elaborar informes sucesivos en un formato fácil de leer. Como resultado, se proporcionan datos sin procesar para variantes pequeñas, amplificaciones, fusiones y variantes alternativas de corte, así como datos específicos y fáciles de usar para variantes de ARN de alta fiabilidad y fusiones.

La aplicación TruSight Tumor 170 está disponible en BaseSpace Sequence Hub. Para los usuarios que deseen un análisis secundario en local, Illumina ofrece una imagen basada en plataforma de la aplicación. Póngase en contacto con su representante de ventas o del servicio de asistencia para obtener más información.

## Detección de variantes sensible y muy segura

La secuenciación exhaustiva que emplea la tecnología NGS ofrece una alta sensibilidad que permite detectar la variación somática en subpoblaciones tumorales. El proceso químico de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina es la tecnología NGS más adoptada y genera más del 90 % de los datos de secuenciación a nivel mundial.\* Cuando se combina con la secuenciación de alta calidad de los sistemas NextSeq y HiSeq, TruSight Tumor 170 ofrece una cobertura uniforme de las regiones objetivo, lo que permite identificar mutaciones somáticas con una frecuencia de alelos mutantes de tan solo el 5 % y una cobertura promedio  $\geq 250\times$  (tabla 2).



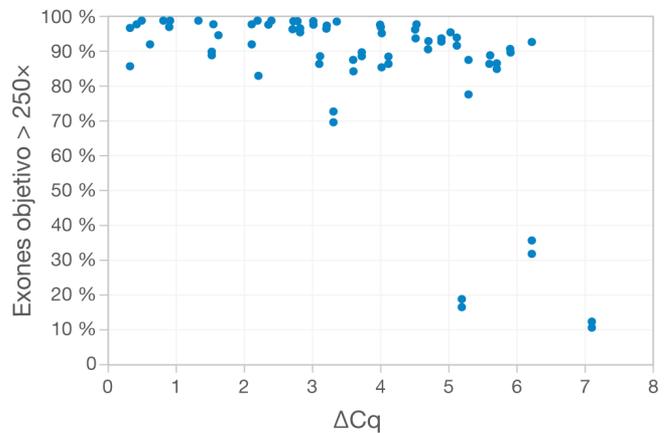
**Figura 2: Flujo de trabajo combinado de preparación de bibliotecas.** Las muestras de ADN y ARN siguen el mismo flujo de trabajo después de los pasos de síntesis de ADNc (para el ARN) y de recorte (para el ADN).

**Tabla 2: Especificaciones**

Parámetro	Detalles
Sistema	Sistema NextSeq o HiSeq 2500
Tamaño del conjunto de pruebas	533 kb para ADN 358 kb para ARN
Tamaño de fragmento mínimo	79 pb para ADN 63 pb para ARN
Cantidad necesaria de ADN de entrada	40 ng en total
Cantidad necesaria de ARN de entrada	40 ng en total
Tiempo de preparación de bibliotecas	32 horas
Duración del experimento de secuenciación	24 horas (sistemas NextSeq) o 27 horas (sistema HiSeq 2500)
Experimento de secuenciación	2 x 101 ciclos
Tamaño del kit	24 muestras (tanto ADN como ARN)
Productividad de muestras	8 muestras por experimento (sistemas NextSeq) o 6 muestras por experimento rápido (sistema HiSeq 2500)
Sensibilidad	Frecuencia de alelos mutantes del 5 % Sensibilidad y especificidad >95 %

### Amplia cobertura de objetivos a partir de muestras de baja calidad

Existe la posibilidad de que los ácidos nucleicos extraídos de tejidos FFPE no superen las comprobaciones del control de calidad y ofrezcan una cobertura de objetivos reducida, lo que reduce en una baja sensibilidad de análisis. TruSight Tumor 170 aborda este problema generando bibliotecas a partir de ácidos nucleicos con un tamaño de fragmento muy pequeño: 79 pb para ADN y 63 pb para ARN. Esto permite una gran cobertura de muestras FFPE, incluso cuando la calidad de los ácidos nucleicos extraídos es baja (figura 3).



**Figura 3: Cobertura de objetivos a partir de muestras FFPE.** Se extrajo el ADN de muestras tumorales FFPE de calidad variada, se analizó con el ensayo de TruSight Tumor 170 y se secuenció en el sistema NextSeq 500. También se evaluó la calidad de cada muestra mediante qPCR para medir el potencial de amplificación del ADN. El valor  $\Delta Cq$  representa el valor del umbral de ciclos (Ct) de cada muestra de ADN menos el valor Ct de un ADN estándar.

\* Cálculos de datos en archivo, Illumina, Inc, 2015.

## Detección fiable de variantes pequeñas a partir de muestras de alta y baja calidad

TruSight Tumor 170 proporciona sensibilidad y precisión para identificar variaciones de baja frecuencia en muestras de calidad variada. Su elevada cobertura de objetivos permite una llamada segura de variantes de nivel bajo en estirpes celulares caracterizadas (tabla 3). TruSight Tumor 170 posibilita la detección de variantes en muestras tumorales FFPE con una frecuencia de alelos mutantes de tan solo el 5 % (tabla 4).

**Tabla 3: Llamada de variantes pequeñas con estirpes celulares caracterizadas**

Gen	Mutación	Frecuencia de indicación	Frecuencia de detección	Cobertura
APC	R2714C	0,33	0,31	2547x
ARID1A	P1562fs	0,34	0,31	419x
BRAF	V600E	0,10	0,11	2282x
BRCA2	A1689fs	0,33	0,30	1097x
EGFR	G719S	0,24	0,22	2207x
EP300	K291fs	0,08	0,06	1359x
FBXW7	G667fs	0,34	0,30	2870x
FGFR1	P150L	0,08	0,08	1102x
FLT3	S985fs	0,10	0,10	1925x
FLT3	V197A	0,12	0,10	1908x
IDH1	S261L	0,10	0,09	2052x
KIT	D816V	0,10	0,15	1239x
KRAS	G13D	0,15	0,14	1507x
KRAS	G12D	0,06	0,07	1503x
MET	V237fs	0,06	0,06	3700x
MLH1	L323M	0,08	0,09	1725x
NF1	L626fs	0,08	0,10	1270x
NOTCH1	P668S	0,32	0,32	1637x
NRAS	Q61K	0,12	0,14	1824x
PDGFRA	G426D	0,34	0,29	2018x
PI3KCA	E545K	0,09	0,16	773x
PI3KCA	H1047R	0,18	0,15	1694x

El ADN de la estirpe celular fijada en formol HD200 (Horizon Diagnostics) que contiene variantes conocidas se evaluó con el ensayo TruSight Tumor 170 y se secuenció en el sistema NextSeq 500. Se observó una concordancia del 100 % con la frecuencia esperada de todas las variantes de HD200.

**Tabla 4: Detección de variantes pequeñas con muestras tumorales FFPE**

Muestra	Mutación indicada	Mutación detectada	Frecuencia de detección	Cobertura
FFPE_Colon	TP53 R158C	TP53 R158C	0,057	1545x
FFPE_Bone	TP53 P72R	TP53 P72R	0,059	515x
FFPE_Brain1	PIK3CA E545G	PIK3CA E545G	0,078	289x
FFPE_Brain2	PIK3CA H1047R	PIK3CA H1047R	0,076	531x
FFPE_Breast	KRAS G12D	KRAS G12D	0,049	1671x
FFPE_Lung1	KRAS G12D	KRAS G12D	0,059	575x
FFPE_Lung2	TP53 C242F	TP53 C242F	0,080	691x
FFPE_Skin	TP53 R248Q	TP53 R248Q	0,050	1240x

Se extrajo el ADN de muestras tumorales FFPE, se analizó con el ensayo de TruSight Tumor 170 y se secuenció en el sistema NextSeq 500. Las 8 muestras FFPE presentaron una concordancia del 100 % con mutaciones identificadas.

## Llamada fiable de amplificaciones, fusiones y variantes alternativas de corte a partir de muestras FFPE

TruSight Tumor 170 combina la sensibilidad de los sistemas de secuenciación de Illumina con las nuevas plataformas de software para permitir la llamada simultánea de amplificaciones, fusiones y variantes alternativas de corte. La aplicación TruSight Tumor 170 incluye nuevos algoritmos de llamada de variantes que producen llamadas precisas para variantes de corte, fusiones y amplificaciones genéticas a partir de datos de secuenciación sin procesar en muestras de calidad variada (tabla 5 y tabla 6).

**Tabla 5: Llamada de amplificaciones con muestras tumorales FFPE**

Muestra	Amplificación identificada	Nivel de amplificación identificado	Amplificación detectada	Nivel de amplificación detectado
FFPE_Bone	FGF19	1,4	FGF19	2,9
FFPE_Brain2	PDGFRA	2,3	PDGFRA	2,9
FFPE_Breast	RPS6KB1	2,4	RPS6KB1	2,4
FFPE_Colon	BRCA2	2,2	BRCA2	2,0
FFPE_Lung1	PIK3CA	2,4	PIK3CA	2,7
FFPE_Lung2	FGFR1	2,4	FGFR1	2,9
FFPE_Lung3	MYC	2,2	MYC	2,8
FFPE_Lung4	CCNE1	2,1	CCNE1	2,2
FFPE_Lung5	EGFR	2,2	EGFR	4,5
FFPE_Lung6	CCND1	2,3	CCND1	2,9
FFPE_Stomach1	CDK6	2,3	CDK6	1,7
FFPE_Stomach2	MET	1,5	MET	1,4

Se extrajo el ADN de muestras tumorales FFPE; a continuación, se analizó con el ensayo de TruSight Tumor 170 y se secuenció en el sistema NextSeq 500. Las 12 muestras FFPE presentaron una concordancia de variantes del 100 %.

Tabla 6: Llamada de fusiones y variantes alternativas de corte con tejidos FFPE y estirpes celulares

Muestra	DV200	Variante identificada	Variante detectada
FFPE_Brain Tissue	N/D	Variante alternativa de corte EGFR VIII	Variante alternativa de corte EGFR VIII
FFPE_Breast Tissue	81	Fusiones RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1	Fusiones RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1
FFPE_Ewing's Tissue	48,9	Fusión EWSR1-FLI1	Fusión EWSR1-FLI1
FFPE_Gastric Cell Line	93	Variante alternativa de corte MET con omisión del exón 14	Variante alternativa de corte MET con omisión del exón 14
FFPE_Lung CellLine	93	Fusión CCDC6-RET	Fusión CCDC6-RET
FFPE_Lung Tissue1	73,3	Fusión EML4-ALK	Fusión EML4-ALK
FFPE_Lung Tissue2	95	Fusiones FGFR3-TACC3	Fusiones FGFR3-TACC3
FFPE_Prostate Cell Line	95,5	Variante alternativa de corte ARV7	Variante alternativa de corte ARV7
FFPE_Prostate Tissue	28,7	Fusiones TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT	Fusiones TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT

Se extrajo el ARN de muestras tumorales FFPE; a continuación, se analizó con el ensayo de TruSight Tumor 170 y se secuenció en el sistema NextSeq 500. Las 9 muestras FFPE presentaron una concordancia de variantes del 100 %. El valor DV200 se utiliza para evaluar la calidad del ARN empleado para preparar bibliotecas de secuenciación y representa el porcentaje de fragmentos de ARN > 200 nucleótidos.

## Resumen

TruSight Tumor 170 ofrece una solución de flujo de trabajo integrado para detectar variantes somáticas comunes que se encuentran en los tumores sólidos. Se preparan, secuencian y analizan simultáneamente bibliotecas de ADN y ARN para evaluar numerosos tipos de variantes somáticas de forma eficaz. Desarrollado conforme a directrices basadas en pruebas fehacientes y con la aportación de los principales líderes de opinión y de investigaciones farmacéuticas en fase avanzada, el conjunto de muestras ofrece a los laboratorios una vista completa de los genes relevantes para el cáncer y un análisis preciso de variantes de baja frecuencia a partir de ADN y ARN FFPE. Al evaluar 170 genes y distintos tipos de variantes en un único ensayo, TruSight Tumor 170 ofrece una investigación genética completa de muestras tumorales en una solución optimizada.

## Información adicional

Para obtener más información sobre TruSight Tumor 170, visite [www.illumina.com/TruSightTumor170](http://www.illumina.com/TruSightTumor170)

## Referencias

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

## Datos para realizar pedidos

Kits de preparación de bibliotecas	N.º de muestras	N.º de catálogo
Kit TruSight Tumor 170	24	OP-101-1004
Kit TruSight Tumor 170, además de PierianDx	24	20032628
Kit TruSight Tumor 170, con reactivos NextSeq v2.5	24	20028821
Kit TruSight Tumor 170, con reactivos NextSeq v2.5, además de PierianDx	24	20032629

illumina, Inc. • 1.800.809.4566 (llamada gratuita, EE. UU.) • Tel.: +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2019 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, visite [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). N.º de pub. 1170-2016-017-E-ESP QB5141

Para uso exclusivo en investigación. Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.

**illumina**<sup>®</sup>

1170-2016-017-E-ESP | 5