

INFORMATIVA Onconext® Precision Liquid

Il continuo avanzare delle conoscenze scientifiche ha permesso di sviluppare test genetici finalizzati a fornire indicazioni terapeutiche personalizzate analizzando il tessuto tumorale. L'insorgenza dei tumori è associata a diversi fattori, tra cui quelli ambientali e predisposizione genetica. Solo una piccola parte di tumori è di origine ereditaria familiare in cui variazioni in determinati geni aumentano il rischio di sviluppare la malattia. La maggior parte dei tumori è definita sporadica ovvero causata da alterazioni che insorgono direttamente nel tessuto colpito. Essendo quindi il cancro una patologia genetica causata dall'accumulo di alterazioni in alcuni geni specifici, analizzare questi geni e altri meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza dei tumori può supportare l'oncologo nel proporre terapie mirate.

Finalità e vantaggi del test Onconext® Precision Liquid

Il pannello Onconext® Precision Liquid permette, con un singolo test, di tracciare il profilo genomico del tumore basato sull'analisi di DNA di più di 500 geni a partire da sangue periferico (biopsia liquida) (Tab.1). Il pannello Onconext® Precision Liquid permette, con un singolo test, di valutare una vasta gamma di varianti e biomarcatori comunemente mutati in numerosi tipi di cancro. Il test analizza oltre 523 geni, per l'identificazione di varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant), inserzioni/delezioni (indel), variazioni del numero di copie (CNV, Copy Number Variation), fusioni geniche, e per l'identificazione dei biomarcatori di instabilità microsatellitare (MSI, Microsatellite Instability) e di carico mutazionale del tumore (TMB, Tumor Mutational Burden)¹⁻⁴.

Tab 1: Geni investigati in TruSight Oncology 500 ctDNA

ABL1	BCL10	CD79B	DAXX	ERCC5	FGF3	GNAQ	GSK3B	KDR	MDM4	NFKBIA	PGR	PTCH1	RPS6KA4	SOX2	TNFAIP3
ABL2	BCL2	CDC73	DCUN1D1	ERG	FGF4	GNAS	H3F3A	KEAP1	MED12	NKX2-1	PHF6	PTEN	RPS6KB1	SOX9	TNFRSF14
ACVR1	BCL2L1	CDH1	DDR2	ERRF1	FGF5	GPR124	IGF1R	KEL	MEF2B	NKX3-1	PHOX2B	PTPN11	RPS6KB2	SPEN	TOP1
ACVR1B	BCL2L1	CDK12	DDX41	ESR1	FGF6	GPS2	IGF2	KIF5B	MEN1	NOTCH1	PIK3C2B	PTPRD	RPTOR	SPOP	TOP2A
AKT1	BCL2L2	CDK4	DHX15	ETS1	FGF7	GREM1	IKBKE	KIT	MET	NOTCH2	PIK3C2G	PTPRS	RUNX1	SPTA1	TP53
AKT2	BCL6	CDK6	DICER1	ETV1	FGFR1	GRIN2A	IKZF1	KLF4	MGA	NOTCH3	PIK3C3	PTPR	RUNX1T1	SRC	TP63
AKT3	BCOR	CDK8	DIS3	ETV4	FGFR2	GRM3	IL10	KLHL6	MITF	NOTCH4	PIK3CA	QKI	RYBP	SRSF2	TRAF2
ALK	BCORL1	CDKN1A	DNAJB1	ETV5	FGFR3	H3F3B	IL7R	KMT2B	MLH1	NPM1	PIK3CB	RAB35	SDHA	STAG1	TRAF7
ALOX12B	BCR	CDKN1B	DNMT1	ETV6	FGFR4	H3F3C	INHBA	KMT2C	MLL	NRAS	PIK3CD	RAC1	SDHAF2	STAG2	TSC1
ANKRD11	BIRC3	CDKN2A	DNMT3A	EWSR1	FH	HGF	HRAS	KMT2D	MLL2	NRG1	PIK3CG	RAD21	SDHB	STAT3	TSC2
ANKRD26	BLM	CDKN2B	DNMT3B	EZH2	FLCN	HIST1H1C	HSD3B1	KRAS	MPL	NSD1	PIK3R1	RAD50	SDHC	STAT4	TSHR
APC	BMPR1A	CDKN2C	DOT1L	FAM123B	FLI1	HIST1H2BD	HSP90AA1	LAMP1	MRE11A	NTRK1	PIK3R2	RAD51	SDHD	STAT5A	U2AF1
AR	BRAF	CEBPA	E2F3	FAM175A	FLT1	HIST1H3A	ICOSLG	LATS1	MSH2	NTRK2	PIK3R3	RAD51B	SETBP1	STAT5B	VEGFA
ARAF	BRCA1a	CENPA	EED	FAM46C	FLT3	HIST1H3B	ID3	LATS2	MSH3	NTRK3	PIM1	RAD51C	SETD2	STK11	VHL
ARFRP1	BRCA2a	CHD2	EGF17	FANCA	FLT4	HIST1H3C	IDH1	LMO1	MSH6	NUP93	PLCG2	RAD51D	SF3B1	STK40	VTCN1
ARID1A	BRD4	CHD4	EGFR	FANCC	FOXA1	HIST1H3D	IDH2	LRP1B	MST1	NUTM1	PLK2	RAD52	SH2B3	SUFU	WISP3
ARID1B	BRIP1	CHEK1	EIF1AX	FANCD2	FOXL2	HIST1H3E	IFNGR1	LYN	MST1R	PAK1	PMAIP1	RAD54L	SH2D1A	SUZ12	WT1
ARID2	BTG1	CHEK2	EIF4A2	FANCE	FOXO1	HIST1H3F	INHBA	LZTR1	MTOR	PAK3	PMS1	RAF1	SHQ1	SYK	XIAP
ARID5B	BTK	CIC	EIF4E	FANCF	FOXP1	HIST1H3G	INPP4A	MAGI2	MUTYH	PAK7	PMS2	RANBP2	SLIT2	TAF1	XPO1
ASXL1	C11orf30	CREBBP	EML4	FANCG	FRS2	HIST1H3H	INPP4B	MALT1	MYB	PALB2	PNRC1	RARA	SLX4	TBX3	XRCC2
ASXL2	CALR	CRKL	EP300	FANCI	FUBP1	HIST1H3I	INSR	MAP2K1	MYC	PARK2	POLD1	RASA1	SMAD2	TCEB1	YAP1
ATM	CARD11	CRF2	EPCAM	FANCL	FYN	HIST1H3J	IRF2	MAP2K2	MYCL1	PARP1	POLE	RB1	SMAD3	TCF3	YES1
ATR	CASP8	CSF1R	EPHA3	FAS	GABRA6	HIST2H3A	IRF4	MAP2K4	MYCN	PAX3	PPARG	RBM10	SMAD4	TCF7L2	ZBTB2
ATRX	CBFB	CSF3R	EPHA5	FAT1	GATA1	HIST2H3C	IRS1	MAP3K1	MYD88	PAX5	PPM1D	RECQL4	SMARCA4	TERC	ZBTB7A
AURKA	CBL	CSNK1A1	EPHA7	FBXW7	GATA2	HIST2H3D	IRS2	MAP3K13	MYO1D	PAX7	PPP2R1A	REL	SMARCB1	TERT	ZFHX3
AURKB	CCND1	CTCF	EPHB1	FGF1	GATA3	HIST3H3	JAK1	MAP3K14	NAB2	PAX8	PPP2R2A	RET	SMARCD1	TET1	ZNF217
AXIN1	CCND2	CTLA4	ERBB2	FGF8	GATA4	HLA-A	JAK2	MAP3K4	NBN	PBRM1	PPP6C	RFWD2	SMC1A	TET2	ZNF703
AXIN2	CCND3	CTNNA1	ERBB3	FGF9	GATA6	HLA-B	JAK3	MAPK1	NCOA3	PDCD1	PRDM1	RHEB	SMC3	TFE3	ZRSR2
AXL	CCNE1	CTNNB1	ERBB4	FGF10	GEN1	HLA-C	JUN	MAPK3	NCOR1	PDCD1LG2	PREX2	RHOA	SMO	TFRC	
B2M	CD274	CUL3	ERCC1	FGF14	GID4	HNF1A	KAT6A	MAX	NEGR1	PDGFRA	PRKAR1A	RICTOR	SNCAIP	TGFBR1	
BAP1	CD276	CUX1	ERCC2	FGF19	GLI1	HNRNP	KDM5A	MCL1	NF1	PDGFRB	PRKCI	RIT1	SOCS1	TGFBR2	
BARD1	CD74	CXCR4	ERCC3	FGF2	GNA11	HOXB13	KDM5C	MDC1	NF2	PKD1	PRKDC	RNF43	SOX10	TMEM127	
BBC3	CD79A	CYLD	ERCC4	FGF23	GNA13	IGF1	KDM6A	MDM2	NFE2L2	PDPK1	PRSS8	ROS1	SOX17	TMPRSS2	

Il contenuto in grigio viene analizzato per il rilevamento CNV. a.) Grandi riarrangiamenti (CNV a livello di esone) rilevati per i geni BRCA1 e BRCA2.

Indicazioni per il test Onconext® Precision Liquid

Il test Onconext® Precision Liquid è indicato per pazienti oncologici al fine di identificare, mediante il DNA tumorale circolante (ctDNA), una terapia personalizzata sulla base delle caratteristiche genetiche del tumore in accordo con le linee guida del settore. Inoltre, essendo un'analisi genomica ad ampio spettro, permette, in caso di pregressi fallimenti terapeutici, di selezionare farmaci mirati in base alla caratterizzazione genomica del ctDNA.

Può essere consigliato in caso di materiale biotipico scarso o assente, per valutazione di efficacia terapeutica, per monitoraggio di recidiva di malattia.

Risultati del test Onconext® Precision Liquid

Il test **Onconext® Precision Liquid** fornisce il profilo genomico del tumore valutando la presenza, nel ctDNA analizzato, delle alterazioni genomiche a carico dei geni descritti in tabella 1.

L'interpretazione del risultato viene modulata tenendo conto della personale storia clinica del paziente e allo specifico pattern mutazionale riscontrato. Sulla base delle mutazioni rilevate nel DNA circolante tumorale, è dunque fornita un'indicazione sulla terapia a maggiore efficacia in base alla profilazione genomica del tumore, unitamente a potenziali resistenze e/o sensibilità terapeutiche. In caso di assenza di alterazioni di potenziale clinico noto e presenza di mutazioni a potenziale beneficio clinico, il risultato descriverà i **trial clinici** disponibili in base alle alterazioni genomiche riscontrate.

Occasionalmente, il test potrebbe fornire un risultato **non conclusivo a seguito di mancato raggiungimento dei criteri minimi di qualità analitica**.

Metodi del test Onconext® Precision Liquid

Per il processamento del test **Onconext® Precision Liquid** viene utilizzato il kit commerciale **Illumina TruSight™ Oncology 500 ctDNA** (TSO500 ctDNA) seguendo il manuale d'uso. I file di sequenziamento vengono analizzati con il software locale Illumina TSO500 v2.2 Local App ed una pipeline di analisi personalizzata all'interno della piattaforma software Clinical Genomics Workspace di PierianDx⁷, che filtra, mappa e allinea le letture ed esegue la chiamata di varianti utilizzando hg19/GRCh37.

Le **varianti** sono riportate secondo la nomenclatura HGVS (www.hgvs.org/mutnomen) e classificate secondo il sistema di **classificazione AMP** in livelli IA, IB, IIC, IID, III e IV. Questi livelli sono stratificati in base all'utilità clinica (per il processo decisionale clinico per quanto riguarda la diagnosi, la prognosi, le opzioni di trattamento e lo stato di portatore) e ai dati precedentemente riportati in letteratura. Le varianti trovate in gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) che hanno una frequenza allelica nella popolazione generale $\geq 1\%$ (eccetto quelle che in ClinVar sono indicate come clinicamente rilevanti) sono classificate come varianti note.

- Le **varianti** vengono filtrate per eliminare le varianti di bassa qualità, gli errori di sequenziamento e le varianti germinali, ed infine annotate.
- Questo test si applica ai pannelli di sequenziamento per il rilevamento di varianti somatiche in pazienti oncologici e non è valido per gli studi di varianti germinali, sequenziamento dell'esoma o sequenziamento dell'intero genoma.
- Verranno refertate solo le varianti non benigne rilevate nei geni studiati (a condizione che la variante sia adeguatamente coperta).
- Il pannello analizzato si concentra sulle regioni codificanti dei geni specificati, per cui non vengono identificate le varianti introniche profonde e le varianti nelle regioni regolatorie.
- Omopolimeri, espansioni di triplette e regioni ad alta omologia con altre regioni genomiche, come pseudogeni o duplicazioni geniche, possono portare a risultati falsi positivi e/o falsi negativi a causa di letture non allineate.
- La sensibilità analitica potrebbe essere compromessa da una scarsa frazione di DNA tumorale circolante o dalla presenza di mutazioni nei siti di ibridazione dei primer.
- Questo test non rileva alterazioni strutturali complesse.
- È possibile che varianti patogenetiche possano non essere identificate a seguito di filtri specifici nell'elaborazione dei dati, specialmente se ad alta complessità. Tuttavia, i parametri dello strumento sono stati ottimizzati per massimizzare la specificità e la sensibilità analitica.

Tramite il test **Onconext® Precision Liquid** si ottengono prestazioni altamente accurate nell'identificazione di mutazioni, con una **sensibilità** analitica $> 96\%$ e una **specificità** analitica superiore al 99,9995%.

Sia i risultati positivi che quelli negativi devono essere interpretati nel contesto delle informazioni cliniche e degli altri risultati di laboratorio; un risultato positivo, anche se altamente suggestivo di un processo maligno, non deve essere utilizzato come unico criterio diagnostico.

Limiti del test Onconext® Precision Liquid

- Verranno refertate esclusivamente le mutazioni che nel campione presentano una frequenza $\geq 1\%$.
- Questo test non rileva le inserzioni/delezioni complesse e le alterazioni strutturali complesse. Anche le mutazioni situate al di fuori delle regioni target non verranno rilevate. Alcune regioni del DNA potrebbero essere escluse a causa di potenziali errori analitici di mappatura dovuti all'omologia di sequenza con altre regioni genomiche.
- L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.
- Alcune di queste varianti potrebbero non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.

Tempi di Refertazione

I tempi stimati di refertazione sono di circa **30 giorni** lavorativi. I tempi di refertazione sopra indicati, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizioni dell'esame, risultati non ottimali, approfondimenti dell'esame o dubbi interpretativi.

Bibliografia

1. **Tray N, Weber JS, Adams S.** Predictive Biomarkers for Checkpoint Immunotherapy: Current Status and Challenges for Clinical Application. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(10):1122-1128. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0214
2. **Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al.** Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019;51(2):202-206. doi:10.1038/s41588-018-0312-8
3. **U.S. Food & Drug Administration.** FDA Approves FirstLine Immunotherapy for Patients with MSI-H/dMMR Metastatic Colorectal Cancer. [fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-line-immunotherapy-patients-msi-hdmmr-metastatic-colorectal-cancer](https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-line-immunotherapy-patients-msi-hdmmr-metastatic-colorectal-cancer).
4. **U.S. Food & Drug Administration.** FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. [fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors](https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors).
5. **Illumina.** Analysis of TMB and MSI Status with TruSight Oncology 500. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/trusight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/trusight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf).
6. **Beroukhi 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
7. **Pierian.** Genomic Knowledgebase. [pieriandx.com/genomicknowledgebase](https://www.pieriandx.com/genomicknowledgebase).