

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Indlægsseddel

TIL IN VITRO DIAGNOSTISK BRUG. KUN TIL EKSPORT.

Erklæret formål

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) er *in vitro* diagnostisk test, der anvender målrettet næstegenerationssekventering til at detektere variationer i 517 gener ved hjælp af nukleinsyrer ekstraheret fra formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) tumorstøvsprøver fra cancerpatienter med solide, maligne neoplasmaer ved hjælp af Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrumentet. Testen kan anvendes til at detektere enkeltnukleotidvariationer, multinukleotidvariationer, insertioner, deletioner og genamplifikationer fra DNA og genfusioner og splejningsvariationer fra RNA. Testen rapporterer også en score for tumormutationsbyrde (TMB) og status for mikrosatellit-instabilitet (MSI).

Testen er tiltænkt som en ledsagende diagnostisk test for at identificere cancerpatienter til behandling med de målrettede behandlinger, der er anført i [Tabel 1](#) i overensstemmelse med godkendt mærkning af terapeutiske produkter. Testen er også beregnet til at angive oplysninger om tumorprofilering, der skal anvendes af kvalificeret sundhedspersonale i overensstemmelse med professionelle retningslinjer, og testen er ikke endegyldig eller foreskrevet til målrettet brug af et specifikt terapeutisk produkt.

Tabel 1 Indikation af ledsagende diagnosticering

Tumortype	Biomarkører	Målrettet behandling
Solide tumorer	NTRK1-, NTRK2- og NTRK3-genfusioner	VITRAKVI® (larotrectinib)

Resumé og forklaring af analysen

Klinisk beskrivelse

Cancer er en af de hyppigste dødsårsager verden over og kan potentielt opstå i alle væv.^{1, 2} Analyse af cancerens genetiske basis er vigtig for at identificere patienter, der kan drage nytte af målrettede behandlinger, og for udvikling af nye behandlingsmetoder. Adskillige gener har været involveret i årsager til og progression af cancer, og mange cancere bærer en række variationer, der påvirker disse gener og deres funktioner. Disse variationer kan omfatte genmutationer, såsom enkeltnukleotidvariationer (SNV'er), multinukleotidvariationer (MNV'er), insertioner og deletioner, genamplifikationer, genfusioner og splejningsvariationer. En anden konsekvens ved cancergenmutationer er præsentation af neoantigener, der kan udløse cancerspecifikke immunreaktioner. En cancers mutationsstatus kan være repræsenteret ved TMB og MSI, som er genomiske signaturer tilknyttet genomisk instabilitet og præsentation af neoantigener i cancere.

TruSight Oncology Comprehensive er en kvalitativ næstegenerationssekventeringstest (NGS) til omfattende genomprofilerings (CGP), der bredt vurderer genomiske variationer i et stort panel af cancerrelaterede gener anført i [Tabel 2](#). Analysen detekterer små variationer i 517 gener plus genamplifikationer, fusioner og splejningsvariationer som indikeret i [Tabel 2](#). Analysen giver kodningssekvensdækning for alle gener bortset fra TERT, hvor kun promoterregionen dækkes, og evaluerer TMB-score og status for MSI. Disse analysemaal omfatter indhold citeret af professionelle organisationer og andre væsentlige amerikanske retningslinjer. Uafhængige konsortiepublikationer og farmaceutisk forskning i den sene fase påvirkede også designet af TSO Comprehensive-analysen.

For en liste over regioner, som er udelukket fra variationsbestemmelse, henvises der til filen *TruSight Oncology Comprehensive Block List* (dokumentnr. 200009524), der findes på [Illumina-supportsiden](#).

I [Tabel 2](#) identificeres fire kategorier af variationstyper: Lille DNA-variation (S), genamplifikation (A), fusion (F), splejningsvariation (Sp). Små DNA-variationer, herunder SNV'er, MNV'er, insertioner og deletioner.

Tabel 2 TSO Comprehensive (EU) Analysegenpanel

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PKD1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFH3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	I/T	I/T	I/T	I/T
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	I/T	I/T	I/T	I/T
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	I/T	I/T	I/T	I/T
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	I/T	I/T	I/T	I/T
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	I/T	I/T	I/T	I/T
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	I/T	I/T	I/T	I/T
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	I/T	I/T	I/T	I/T
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	I/T	I/T	I/T	I/T

Procedureprincipper

TSO Comprehensive (EU)-analysen er en distribueret test, der udføres ved hjælp af manuelt ekstraheret nukleinsyre som inputmateriale. DNA og/eller RNA ekstraheret fra formalinfikseret paraffinindlejret (FFPE)-væv anvendes til at klargøre biblioteker, der herefter beriges for-cancerrelaterede gener og sekventeres på NextSeq 550Dx-instrument.

TSO Comprehensive (EU)-analysen involverer følgende processer.

- **Klargøring og berigelse af bibliotek** – I alt 40 ng RNA konverteres til dobbeltstrenget komplementær DNA (cDNA). For genomisk DNA (gDNA) skæres 40 ng gDNA over i små fragmenter. Universelle adaptore til sekventering liggeres på cDNA'et og gDNA-fragmenterne. P5- og P7-adaptersekvenser inkorporeres i hvert

bibliotek for at muliggøre indfangning af biblioteksfragmenter på overfladen af gennemstrømningscellen under sekventering. Adapterne omfatter i5- og i7-indekssekvenser til at identificere hver individuelle prøve og, i tilfælde af biblioteker fra gDNA-prøver, individuelle molekyler ved hjælp af unikke molekulære identifikatorer (UMI'er). Herefter beriges bibliotekerne for de specifikke gener af interesse baseret på en indfangningsmetode. Biotinylerede probesekvenser, der spænder over genregionerne af interesse, som analysen er målrettet mod, hybridiseres til bibliotekerne. Proberne og de hybridiserede, målrettede biblioteker isoleres fra ikke-målrettede biblioteker ved indfangning med streptavidin magnetiske perler. De målrettede, berigede biblioteker vaskes og amplificeres. Kvantiteten af hvert beriget bibliotek normaliseres herefter ved hjælp af en perlebaseret metode for at sikre en ligelig fordeling af de samlede biblioteker til sekventering.

- **Sekventering og primær analyse** – Normaliserede, berigede biblioteker samles i klynger på en gennemstrømningscelle og sekventeres ved hjælp af sekventering ved syntesekemi (SBS) på NextSeq 550Dx. SBS-kemi anvender en reversibel terminator-metode til at detektere enkelte, fluorescensmærkede deoxynukleotidtriphosphatbaser (dNTP), når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Under hver sekventeringscyklus tilføjes en enkelt dNTP til nukleinsyre kæden. dNTP-mærkatet fungerer som en terminator for polymerisering. Efter hver inkorporering af dNTP bruges det fluorescerende farvestof til at identificere basen og spaltes herefter for at muliggøre inkorporering af det næste nukleotid. Fire reversible, terminator-bundne dNTP'er (A, G, T og C) er til stede som enkelte, separate molekyler. Som følge heraf minimerer naturlig konkurrence inkorporeringsbias. Under den primære analyse foretages basebestemmelser direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekventeringscyklus, hvilket resulterer i base-for-base-sekventering. Der tildeles en kvalitetsscore til hver basebestemmelse.
- **Sekundær analyse** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul er integreret i NextSeq 550Dx-instrumentet som en del af Local Run Manager-softwaren for at formidle TSO Comprehensive (EU)-kørselskonfigurationen og foretage den sekundære analyse af sekventeringsresultaterne. Sekundær analyse omfatter validering af kørslen og kvalitetskontrol, efterfulgt af demultiplexing, generering af FASTQ-fil, alignment og variationsbestemmelse. Demultiplexing adskiller data fra samlede biblioteker baseret på de unikke sekvensindekser, der blev tilført under proceduren til klargøring af bibliotek. Midlertidige FASTQ-filer genereres, der indeholder sekventeringslæsninger for hver prøve samt kvalitetsscorer, hvor læsninger fra alle clustre, der ikke passerede filteret, udelukkes. Sekventeringslæsningerne tilpasses herefter i forhold til et referencegenom for at identificere en relation mellem sekvenserne og tildeles en score baseret på områder med lighedspunkter. Tilpassede læsninger skrives til filer i BAM-format. Analysesoftwaren anvender separate algoritmer til biblioteker genereret fra DNA- og/eller RNA-prøver til at bestemme små DNA-varianter, genamplifikationer, TMB og MSI for DNA-prøver og fusioner og splejningsvariationer for RNA-prøver. Analysesoftwaremodulet genererer flere output, herunder sekventeringsmålinger og variationsbestemmelsesfiler (VCF). VCF-filer indeholder oplysninger om variationer fundet ved specifikke positioner i et referencegenom. Sekventeringsmålinger og individuelle output-filer genereres for hver prøve. For detaljer om sekundær og tertiær analyse, se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661)*.

- **Tertiær analyse** – Tertiær analyse, der udføres af Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul, består af TMB- og MSI-beregninger, ledsagende diagnostikbestemmelser, tumorprofilering af variationer i to niveauer af klinisk signifikans ved hjælp af en vidensbase (KB) og vævstypen samt generering af en rapport over resultaterne. Tumorprofilering kan også kaldes omfattende genomprofilering. De fortolkede variationresultater samt resultater for TMB- og MSI-biomarkører er opsummeret i TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten.

Procedurens begrænsninger

Kun til *in vitro* diagnostisk brug.

- Må kun anvendes på ordination. Testen skal anvendes i overensstemmelse med forordninger for kliniske laboratorier.
- Listen over genomfund i [Tabel 2](#) over tilsigtet brug er ikke foreskrevet eller endegyldig til målrettet brug af eventuelt specifikt terapeutisk produkt.
- Der er ikke foretaget klinisk validering af variationer, der er anført i TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten under Genomfund med evidens for klinisk signifikans (niveau 2) og genomfund med potentiel klinisk signifikans (niveau 3).
- Beslutninger vedrørende patientpleje og behandling skal være baseret på den behandlende læges uafhængige, medicinske vurdering under hensyntagen til alle gældende oplysninger om patientens forhold og familiehistorik, fysiske undersøgelser, oplysninger fra andre diagnostiske test og patientpræferencer i overensstemmelse med standarden for pleje i et givet samfund.
- Kvaliteten af FFPE-prøven varierer meget. Prøver, der ikke har undergået standardprocedurer for fiksering, genererer muligvis ikke ekstraherede nukleinsyrer, der opfylder kravene til analysens kvalitetskontrol ([Kvalitetskontrol på side 77](#)). FFPE-blokke, der har været opbevaret i mere end fem år, har udvist lavere validitet.
- Ydeevnen for TSO Comprehensive (EU) i prøver, der stammer fra patienter, der har fået foretaget organ- eller vævstransplantation, er ikke blevet evalueret.
- Højt indhold af nekrotisk væv ($\geq 23\%$) kan forstyrre TSO Comprehensive (EU)-analysens evne til at detektere genamplifikationer og RNA-fusioner.
- Påvisning af somatiske drivermutationer kan være upålidelig, hvis tumorindholdet (efter område) er mindre end 20 %.
- Et resultat af mikrosatellitstabil (MS-Stable) kan være upålideligt, hvis tumorindholdet er mindre end 30 %. Et resultat af mikrosatellit høj (MSI-høj) er korrekt uanset tumorindhold.
- Hæmoglobin forbundet med vævsreduktioner, der understøtter læsninger for MET-splejsningsvariationer.
- I højt omarrangerede genomer med deletioner og tab af heterozygositet kan TSO Comprehensive (EU)-softwaren fejlagtigt klassificere en DNA-prøve som kontamineret $\text{CONTAMINATION_SCORE} > 3106$ og $p\text{-værdi} > 0,049$.

- Et negativt resultat udelukker ikke tilstedeværelsen af en mutation, der er under analysens detektionsgrænse (LoD).
- Følsomheden af detektering af små DNA-varianter kan være påvirket af:
 - Genomisk kontekst med lav kompleksitet.
 - Stigende variationslængde.
- I de følgende sammenhænge kan TMB-scorer være unøjagtige:
 - Hvis tumorindholdet når niveauer, hvor kimcelle- og somatisk variationsallelfrekvenser (VAF'er) konvergerer.
 - Hos populationer, der ikke er godt repræsenteret i offentlige databaser.
- Genamplifikationer er de eneste kopinummervarianter rapporteret af TSO Comprehensive (EU). Deletioner af gener rapporteres ikke af analysen.
- Fusionsbestemmelsesalgoritmer i TSO Comprehensive (EU)-analysesoftwaren tager muligvis ikke højde for evidens fra læsninger, der strækker sig uden for de annoterede gengrænser.
- Følsomheden af detektering af fusioner kan være påvirket af:
 - Lav bibliotekskompleksitet, der medfører en reduktion i understøttende læsninger som følge af afvigelser i analysens arbejdsgang (f.eks. efter blandingstrinnene i [Denaturering og annealing af RNA på side 41](#)).
 - Når et enkelt gen omfatter begge brudpunkter.
 - I tilfælde, hvor flere brudpunkter for fusioner er tæt på hinanden med én eller flere partnere, rapporteres flere brudpunkter og partnere muligvis som et enkelt brudpunkt og en enkelt partner.
 - Ved små median indsættelsesstørrelser. Der kræves en minimal median indsættelsesstørrelse på 80 bp, men følsomheden falder i intervallet 80-100 bp.
 - Ved lav sekvenskompleksitet eller homologt genomisk indhold omkring fusionsbrudpunkter.
- Opløsning af gener i en fusion kan blive påvirket, når fusionsbrudpunkter opstår i genomiske regioner, der indeholder overlappende gener. Analysen rapporterer alle gener adskilt af semikolon, hvis flere gener overlapper et brudpunkt.
- Inkonsekvent dækning i TERT-promotorregionen kan medføre No Result (Intet resultat) på grund af lav dybde.
- Annotationsfejl eller fejl i vidensbasen kan medføre et falsk positivt eller falsk negativt resultat, herunder at en variation anføres på det forkerte niveau (mellem Genomfund med evidens for klinisk signifikans [niveau 2] og Genomfund med potentiel klinisk signifikans [niveau 3]), eller annotationsoplysningerne i rapporten kan være forkerte. Variationer, der rapporteres i CDx-resultater, påvirkes ikke af annoterings- eller KB-fejl. Muligheden for fejl kan opstå fra følgende tre kilder:
 - TSO Comprehensive (EU)-variationsannotering. Der er en fejlrate på ca. 0,0027 % baseret på en analyse af 2.448.350 variationer fra COSMIC v92, og muligheden for fejl er derfor lav.
 - Fejl i videnbase som følge af processen til organisering.

- Relevansen af videnbasens indhold ændrer sig over tid. Rapporten afspejler den tilgængelige viden på det tidspunkt, hvor videnbasen blev organiseret.
- TSO Comprehensive (EU) er designet til at rapportere somatiske variationer ved rapportering af variationer med evidens for klinisk signifikans eller variationer med potentiel klinisk signifikans. Som en test udelukkende med tumor er rapportering af kimcellevariation (nedarvet) mulig, men utilsigtet. TSO Comprehensive (EU) bruger en KB til at rapportere variationer uden eksplicit at annotere, hvorvidt de er af kimcelleoprindelse eller somatisk oprindelse.
- Videnbasen omfatter udelukkende terapeutiske, diagnostiske og prognostiske tilknytninger, der er relevante for variationer, som er til stede i en etableret solid malign neoplasme. Følsomheds- eller cancerrisikotilknytninger er ikke inkluderet i videnbasen.
- Følgende tabel viser nukleotidændringerne for tre RET-variationer, som analysen ikke kan detektere. Andre nukleotidændringer for den samme aminosyreændring kan påvises.

Tabel 3 Nukleotidændringer for tre RET-variationer

Aminosyreændring	Kromosom*	Position	Reference Allele (Referenceallel)	Alternativ
p.E632_ A640delinsVRP	krom10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	krom10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_R635insPK	krom10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = kromosom

Produktets komponenter

TSO Comprehensive (EU)-testen består af følgende komponenter:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU)-sæt (Illuminakatalognr. 20063092) – Sættet indeholder reagenser med tilstrækkeligt volumen til at generere 24 DNA- og 24 RNA-biblioteker. Denne volumen inkluderer patientprøver og kontroller. Kontroller sælges separat (se [Nødvendige reagenser, medfølger ikke på side 16](#)).
- Vidensbase: Opdateres regelmæssigt og kan downloades på Illumina Lighthouse-portalen.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul (Illuminakatalognr. 20051843), som indeholder følgende komponenter:

- TSO Comprehensive Kravpakker
- TSO Comprehensive Softwarepakke
- TSO Comprehensive USB-sæt

En Illumina servicerepræsentant installerer den relevante version af TSO Comprehensive (EU)-analysemodul på Local Run Manager NextSeq 550Dx-instrument. For oplysninger om analysemodulet, henvises til Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661).

Reagenser

Medfølgende reagenser

Følgende reagenser leveres sammen med TSO Comprehensive (EU)-sættet.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, Delnummer 20031127

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte, DNA-polymerase, RNase H og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og vilkårlige hexamerer	-25 °C til -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder reverse transcriptase	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (frys), delnummer 20031118

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
End repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder T4 DNA-polymerase og polynukleotidkinase	-25 °C til -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder ligase	-25 °C til -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder universelle oligonukleotider til sekventering	-25 °C til -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder universelle oligonukleotider til sekventering	-25 °C til -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), Delnummer 20031119

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler	2 °C til 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-opløsning	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, Delnummer 20031120

Aktive stoffer: Bufret vandig opløsning indeholdende oligonukleotidprimere forsynet med individuel stregkode.



FORSIGTIG

Brug unikke indeksprimere (UPxx) til RNA- eller DNA-prøver. CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i samme bibliotek.

Indeksprimer	Delnummer	Stk.	Volumen	i7-indeks	i7-sekvens	i5-indeks	i5-sekvens	Opbevaringstemperatur
UP01	20031445	1	24 µl	D702	TCCGGAGA	D503	AGGATAGG	-25 °C til -15 °C
UP02	20031446	1	24 µl	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGAGCC	-25 °C til -15 °C
UP03	20031447	1	24 µl	D717	CGTAGCTC	D509	CATCCGAA	-25 °C til -15 °C
UP04	20031448	1	24 µl	D706	GAATTCGT	D510	TTATGAGT	-25 °C til -15 °C
UP05	20031449	1	24 µl	D712	AGCGATAG	D513	ACGAATAA	-25 °C til -15 °C
UP06	20031450	1	24 µl	D724	GCGATTAA	D515	GATCTGCT	-25 °C til -15 °C
UP07	20031451	1	24 µl	D705	ATTCAGAA	D501	AGGCTATA	-25 °C til -15 °C
UP08	20031452	1	24 µl	D713	GAATAATC	D502	GCCTCTAT	-25 °C til -15 °C
UP09	20031453	1	24 µl	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	-25 °C til -15 °C
UP10	20031454	1	24 µl	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	-25 °C til -15 °C
UP11	20031455	1	24 µl	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	-25 °C til -15 °C
UP12	20031456	1	24 µl	D701	ATTACTCG	D518	GACTTCCT	-25 °C til -15 °C
UP13	20031457	1	24 µl	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	-25 °C til -15 °C
UP14	20031458	1	24 µl	D714	ATGCGGCT	D512	TAGCCGCG	-25 °C til -15 °C
UP15	20031459	1	24 µl	D718	GCCTCTCT	D514	TTCGTAGG	-25 °C til -15 °C
UP16	20031460	1	24 µl	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, Delnummer 20031126

Aktive stoffer: Bufret vandig opløsning indeholdende oligonukleotidprimere forsynet med individuel stregkode.

**FORSIGTIG**

Brug kun kombinatoriske indeksprimere (CPxx) til DNA-prøver. CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i samme bibliotek.

Indeksprimer	Delnummer	Stk.	Volumen	i7-indeks	Sekventering	i5-indeks	Sekventering	Opbevaringstemperatur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), Delnummer 20031123

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder formamid og salte	2 °C til 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og fast fase-paramagnetiske perler kovalent coatet med streptavidin	2 °C til 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxidopløsning	2 °C til 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder fast fase-paramagnetiske perler	2 °C til 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNBW1)	20031482	2	4,8 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte 2-Mercaptoethanol og formamid	2 °C til 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), Delnummer 20031121

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder oligonukleotider	-25 °C til -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder rensemiddel	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder P5- og P7-primere	-25 °C til -15 °C

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte 2- Mercaptoethanol og formamid	-25 °C til -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 eller PhiX)	20031492	1	10 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder PhiX genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, Delnummer 20031122

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotid-probepool	-25 °C til -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotid-probepool	-25 °C til -15 °C

Nødvendige reagenser, medfølger ikke

Reagenser før amplifikation

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents – Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25](#) for krav til reagenser.
- DNA and RNA Quantification Reagents – Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25](#) på side 1 for krav til reagenser.
- TruSight Oncology-kontroller:
 - TruSight Oncology DNA-k ontrol (Illumina katalognr. 20065041)
 - TruSight Oncology RNA-k ontrol (Illumina katalognr. 20065042)
- Ethanol (EtOH) 100 % (200 proof) til molekylærbiologi
- RNase/DNase-free water

Reagenser efter amplifikation

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklusser) (Illumina katalognr. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklusser)

- EtOH 100 % (200 proof) til molekylærbiologi
- RNase/DNase-free water

Opbevaring og håndtering af reagens

Følgende reagensæsker afsendes frosne. Opbevares ved -25 °C til -15 °C.

Æske	Delnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post amplifikation
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post amplifikation



FORSIGTIG

Opbevar ikke reagenser på et-frostfrit opbevaringssted eller i rum i køleskabsdøren.

Følgende reagensæsker afsendes på gelpakker for at opretholde en temperatur på 0 °C til 10 °C. Opbevares ved 2 °C til 8 °C.

Æske	Delnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post amplifikation



FORSIGTIG

Reagenser, der indeholder perler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.

- Ændringer i reagensernes udseende kan være tegn på nedbrydning af materialerne. Reagenserne må ikke anvendes, hvis de ændrer udseende (f.eks. farveændring eller uklarhed).
- FSM, SSM, ERA1-B og TCB1 kan have produktrelaterede partikler. Følg de specifikke retningslinjer for håndtering af hvert reagens. Efter udførelse af FSM- og SSM-blandingstrinene vil de resterende hvide produktrelaterede partikler ikke påvirke ydeevnen.
- Stabiliteten af TSO Comprehensive (EU)-analysen er blevet evalueret og ydeevne påvist for op til fire anvendelser af sættet. Ved opbevaring ved de indikerede temperaturer er reagenserne stabile indtil den udløbsdato, der er anført på æskens mærkat.

Udstyr og materialer

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, medfølger ikke

Udstyr og materialer præ-amplifikation

Udstyr	Leverandør
Ultrasonikator med tilknyttet ekstraudstyr Se Konfigurationsindstillinger for ultrasonikator til DNA-fragmentering på side 21 .	Almén laboratorieleverandør
Termocykler med følgende specifikationer: - Opvarmet låg, der kan indstilles til 30 °C og 100 °C (eller slukket, hvis det ikke kan opvarmes til 30 °C) - Omfatter et temperaturinterval på 4 °C til 99 °C - Temperaturpræcision: ± 0,25 °C - Kompatibel med PCR-plader med 96 brønde, 0,2 ml - Se Temperaturændringshastighed for termocykler på side 23	Almén laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubatorer (2) med indsatser til 96-brønds MIDI-plader (2)	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almén laboratorieleverandør
Pladecentrifuge med følgende specifikationer: - Kompatibilitet med mikroplader med 96 brønde - Kapacitet til 280 × g (+/- 10 %)	Almén laboratorieleverandør
Pladeryster med følgende specifikationer: 2 mm orbital radius - Kan omryste ved 1200 og 1800 o/min.	Almen laboratorieleverandør
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk holder med følgende specifikationer: - Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation - Magneter på siden af stativet, (ikke i bunden) - Kompatibilitet med MIDI-plader med 96 brønde	Almén laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
Præcisionspipetter, der nøjagtigt kan levere volumener fra 2 µl til 1000 µl med følgende specifikationer: • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,02 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,1 µl, 0,2 µl, eller 0,5 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 1 µl eller 2 µl Pipetter skal kalibreres regelmæssigt og have en nøjagtighed inden for 5 % i forhold til den angivne volumen.	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
Is eller kølelegeme	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: • Kan pilles af • Passer til PCR-plader med skørt eller halvskørt • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -20 °C til 100 °C • DNase/RNase-frit	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør med kapacitet på 1,7 ml, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensreservoirer (skål til engangsbrug, 50 ml) (eller tilsvarende)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
Kompatible aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
PCR-plader med 96 brønde, der er kompatible med termocykler, 0,2 ml (brønde af polypropylen)	Almén laboratorieleverandør

Udstyr og materialer post amplifikation

Udstyr	Leverandør
NextSeq 550Dx instrument	Illumina, katalognr. 20005715
Pladecentrifuge med følgende specifikationer: • Kompatibilitet med mikroplader med 96 brønde • Kapacitet til 280 × g (+/- 10 %)	Almén laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
Termocykler med følgende specifikationer: • Opvarmet låg (100 °C) • Omfatter et temperaturinterval på 4 °C til 99 °C • Temperaturpræcision: $\pm 0,25$ °C • Kompatibel med PCR-plader med 96 brønde, 0,2 ml • Se Temperaturændringshastighed for termocykler på side 23	Almén laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator med indsats til 96-brønds MIDI-plader	Almen laboratorieleverandør
Tør varmeblok med følgende specifikationer: • Temperaturinterval på 25 °C til 99 °C • Temperaturpræcision: ± 5 °C • Kontrollér, at mikrocentrifugerørene er kompatible med varmeblokken	Almén laboratorieleverandør
Pladeryster med følgende specifikationer: • 2 mm orbital radius • Kan omryste ved 1200 og 1800 o/min.	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk holder med følgende specifikationer: • Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation • Magneter på siden af stativet, (ikke i bunden) • Kompatibilitet med MIDI-plader med 96 brønde	Almén laboratorieleverandør
Præcisionspipetter, der nøjagtigt kan levere volumener fra 2 µl til 1000 µl med følgende specifikationer: • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,02 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,1 µl, 0,2 µl, eller 0,5 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 1 µl eller 2 µl Pipetter skal kalibreres regelmæssigt og have en nøjagtighed inden for 5 % i forhold til den angivne volumen.	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: • Kan pilles af • Passer til PCR-p lader med skørt eller halvskørt • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -20 °C til 100 °C • DNase/RNase-frit	Almén laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør med kapacitet på 2 ml, nukleasefrit	Almén laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør med kapacitet på 1,7 ml, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensreservoirer (skål til engangsbrug, 50 ml) (eller tilsvarende)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
Kompatible aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
PCR-plader med 96 brønde, der er kompatible med termocykler, 0,2 ml (brønde af polypropylen)	Almen laboratorieleverandør
Is eller kølelegeme	Almen laboratorieleverandør

Konfigurationsindstillinger for ultrasonikator til DNA-fragmentering

DNA-fragmentering eller -afklipning har indflydelse på analysens ydeevne ved bestemmelse af fordeling af fragmentstørrelse, der til gengæld påvirker sekventeringsdækningen. Flere konfigurationer målrettet mod ultrasonikering blev evalueret og optimeret for TSO Comprehensive (EU)-analysen ([Tabel 4](#)).

- Afklipningstiden blev justeret for at maksimere målingen MEDIAN_EXON_COVERAGE beskrevet under [Kvalitetskontrol på side 77](#). Afklipningstider (se [Tabel 4](#)) og resultaterne for MEDIAN_INSERT_SIZE afveg på tværs af konfigurationer.
- Konfiguration 1-4 og 6 blev testet med glastrør med 8 strimler. Konfiguration 5 brugte et enkelt glastrør. Rørvolumenkapaciteter er vist i [Tabel 4](#).
- Optimering af konfiguration 3-6 (mindre vandbadsvolumener) brugte pulsering.
- Konfigurationerne 3-5 blev skåret i rør med mindre volumen. Rørvolumenkapaciteter påvirker afklipningsparametrene.

- Konfiguration 4 (linjetransducer, mellemstor vandbadsvolumen, afgasset vand) krævede en lang impulsforsinkelsestid (40 sekunder) for at opnå samme MEDIAN_EXON_COVERAGE som konfiguration 1 og 2 ved nominelt 40 ng input.
- Optimale indstillinger for konfiguration 3 resulterede i en lidt større fordeling af fragmentstørrelsen sammenlignet med de andre konfigurationer (MEDIAN_INSERT_SIZE var ca. 5-10 basepar større).
- Konfiguration 3 og 5 brugte ikke-afgasset vand og den mindste volumen for vandbad.
- Konfiguration 3 og 5 krævede øget DNA-bidrag (50 ng for konfiguration 3, 60 ng for konfiguration 5) for at opnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE i forhold til de andre 4 konfigurationer, som brugte det nominelle 40 ng input.
- Konfiguration 3 og 5 har mere skade og/eller denaturering, og har derfor en reduceret effektiv masse af brugbare dsDNA-molekyler til klargøring af bibliotek.

Centrifuger rørene til afklipning under gendannelsesprocessen for at sikre, at den specificerede volumen hentes, da ethvert tab af materiale kan påvirke ydeevnen i negativ retning.

Tabel 4 Evaluerede konfigurationer målrettet mod ultrasonikering

Parameter	Konfiguration					
	1	2	3	4	5	6
Transducer	Linje	Punkt	Punkt	Linje	Punkt	Linje
Volumen for vandbad	5 L	5 L	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Afgasset vand	Ja	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
Vandkøler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Vandbadets temperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Spidseffekt (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% driftscyklus	30	10	30	25	20	25
Cykusser per spring	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsering (10 sekunders spring)	Nej	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Pulseringsforsinkelsestid	I/T	I/T	10 s	40 s	10 s	10 s
Afklipningstid	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Behandling af prøver	1-8	1	1	1-8	1	1-8
Partistørrelse	1-96	1-96	1-8	1-8	1	1-96
Glaserør med en prøvestørrelse på 8 strimler	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkeltrør (50 µl)	130 µl (eller 96 microTUBE-plade)
Blanding af farver	I/T	I/T	I/T	3 mm Y ved 20 mm/s	I/T	1,5 mm Y ved 10 mm/s
Ækvivalent DNA-bidrag (for median exondækning)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Afklipningstiden på 200 sekunder består af 10 sekunders spring med 20 gentagelser.

² Afklipningstiden på 320 sekunder består af 10 sekunders spring med 32 gentagelser.

Temperaturændringshastighed for termocykler

Temperaturændringshastigheden for termocykler påvirker kvalitetskontrolmålinger (brugbare MSI-steder, medianværdi for bin-tælling per CNV-mål, medianværdi for indsatsstørrelse (RNA)) samt understøttende læsninger for splejningsvariationer og fusioner. Optimering af temperaturændringshastigheden for termocykler anbefales. En testet model blev f.eks. justeret fra en standard (og maksimal) ændringshastighed på 5 °C/sek. til 3 °C/sek. for at opnå sammenlignelige resultater med andre modeller med lavere standard ændringshastigheder.

Prøveindsamling, transport og opbevaring

Følg standardprocedurer ved indhentning, transport, opbevaring og behandling af prøver.

Krav til prøver

FFPE-væv

TSO Comprehensive (EU)-analysen kræver 40 ng RNA og/eller 40 ng DNA ekstraheret fra FFPE-væv. Brug af både RNA og DNA muliggør analyse af alle krævede variationstyper. Vævet skal fikseres ved hjælp af formalinfiksativ, der er egnet til molekylæranalyser (f.eks. 10 % neutral-bufret formalin). Væv må ikke afkalkes. Inden TSO Comprehensive (EU)-analysen udføres, skal vævet undersøges af en patolog for at sikre, at det er egnet til denne test. Der kræves et tumorindhold på minimum 20 % (efter område) for at detektere somatiske aktiverende mutationer. Pålidelig påvisning af MSI-status på tværs af en række prøver kræver mindst 30 % tumorindhold. Hvis en prøve testes med mindre end 30 % tumorindhold for at bestemme resultater med andre variationstyper, kan et MS-stabilt resultat være upålideligt. Et MSI-Høj-resultat er korrekt uanset tumorindhold.

Tumorindholdet i genamplifikationer og RNA-variationer afhænger af omfanget af amplifikation eller fusionsekspression (se [Tumorindhold på side 99](#)).

For at opnå en høj sandsynlighed for at ekstrahere 40 ng RNA og 40 ng DNA fra forskellige typer fast væv er det anbefalede vævsvolumen $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Dette volumen svarer til et kumulativt levedygtigt vævsområde på $\geq 200 \text{ mm}^2$ ved hjælp af $5 \text{ }\mu\text{m}$ tykke sektioner eller $\geq 100 \text{ mm}^2$ ved hjælp af $10 \text{ }\mu\text{m}$ tykke sektioner. Det kumulative vævsområde er summen af det levedygtige vævsområde i alle sektioner, der sendes til ekstraktion. Et kumulativt vævsområde på 200 mm^2 kan f.eks. opnås ved at ekstrahere fire $5 \text{ }\mu\text{m}$ sektioner med 50 mm^2 vævsområde hver eller fem $10 \text{ }\mu\text{m}$ sektioner med 20 mm^2 vævsområde hver. Vævsnekrose kan reducere udbyttet af nukleinsyre. For at minimere muligheden for resultater med falsk negativ kan vævet makrodissekteres for at opnå et ønsket levedygtigt tumorindhold.

Højt indhold af nekrotisk væv ($\geq 23 \%$) kan forstyrre TSO Comprehensive (EU)-analysens evne til at detektere genamplifikationer og RNA-fusioner. Hvis prøvesektionen indeholder mere end 23 % nekrose i det samlede vævsområde, skal det nekrotiske væv makrodissekteres. Hvis laboratoriet kører RNA sammen med analysen, skal væv med hæmoglobin undgås eller minimeres, når der tages snit fra vævsblokken. Se [Interfererende stoffer på side 90](#).

FFPE-væv på objektglas kan opbevares i op til 28 dage ved stuetemperatur.

Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring

- Ekstrahér RNA og DNA fra FFPE-vævsprøver ved hjælp af kommercielt tilgængelige ekstraktionssæt. Forskelle i ekstraktionssæt kan påvirke ydeevnen. Se [Evaluering af sæt til nukleinsyreekstraktion på side 89](#).
- Proteinase K eller tilsvarende enzym må ikke øges under ekstraktion fra standardkoncentrationen i et ekstraktionssæt. Se [Interfererende stoffer på side 90](#).
- Opbevar ekstraheret stamnukleinsyre i henhold til instruktionerne fra producenten af ekstraktionssættet.
- Opbevar ekstraheret DNA i op til 28 dage ved -25 °C til -15 °C.
- Opbevar ekstraheret RNA i op til 28 dage ved -85 °C til -65 °C.
- For at undgå ændringer i koncentrationen over tid skal DNA og RNA måles indenfor for 28 dage inden klargøring af bibliotek påbegyndes. Kvantificér RNA og DNA ved hjælp af en metode til fluorometrisk kvantificering, der anvender farvestoffer, som binder nukleinsyre. Nukleinsyrekoncentrationen skal være gennemsnittet af mindst tre målinger.
- Analysen kræver 40 ng af hver RNA-prøve klargjort i RNase/DNase-free water (medfølger ikke) med en endelig volumen på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Analysen kræver 40 ng af hver gDNA-prøve med en minimum ekstraktionskoncentration på 3,33 ng/µl. Afklipning kræver et endeligt volumen på 52 µl (0,77 ng/µl) med minimum 40 µl TEB (medfølger) anvendt som fortynder.

Biblioteksopbevaring

Du kan opbevare biblioteker iPCR-plader med lav binding i 7 til 32 dage, afhængigt af bibliotekstypen (se [Tabel 5](#)).

Tabel 5 Opbevaringstider for bibliotek

Bibliotekstype	Plade	Antal dage	Opbevaringstemperatur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Fragmenteret gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Inden berigelse	ALS PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Efter berigelse	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
PCR efter berigelse	PL PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Normaliseret	NL PCR	≤ 32	-25 °C til -15 °C

Advarsler og forholdsregler

Sikkerhed



ADVARSEL

Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Ventilation skal være egnet til håndtering af farlige materialer i reagenser. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder beskyttelsesbriller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfare. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- Alle prøver skal håndteres, som om de er infektiøse.
- Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel ved håndtering af prøver og analysereagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og analysereagenser.

Laboratorie

- For at forhindre kontamination skal laboratoriet indrettes med en ensrettet arbejdsgang. Områder til før og efter amplifikation skal have dedikeret udstyr og materialer (f.eks. pipetter, pipettespidser, vortexblandere og centrifuge). For at forhindre overførsel af amplifikationsprodukt eller probe skal man undgå at returnere til området, der anvendes før amplifikation, når man er gået ind i området, der anvendes efter amplifikation.
- Udfør trinnene Indeks PCR og Berigelse i et område, der anvendes efter amplifikation for at forhindre overførsel af amplifikationsprodukt.
- Procedurerne til klargøring af bibliotek kræver et RNase/DNase-frit miljø. Dekontaminér arbejdsområderne grundigt med et RNase/DNase-inhiberende- rensmiddel. Brug plast, der er certificeret til at være fri for DNase, RNase og humant genomisk DNA.
- For procedurer efter amplifikation skal arbejdsområderne rengøres grundigt før og efter hver procedure med en frisk fremstillet 0,5 % natriumhypochloritopløsning (NaOCl). Lad blandingen være i kontakt med overflader i 10 minutter, og tør efter med 70 % ethyl- eller isopropylalkohol.
- Brug nukleasefrie mikrocentrifugerør, plader, pipettespidser og reservoirer.
- Brug kalibreret udstyr gennem hele analysen. Sørg for at kalibrere udstyret til de hastigheder, temperaturer og volumener, der er angivet i denne protokol.
- Brug præcisionspipetter for at sikre nøjagtig levering af reagens og prøve. Kalibrér regelmæssigt i henhold til producentens specifikationer.

- Brug følgende retningslinjer ved brug af multikanalpipetter:
 - Pipettér minimum $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Sørg for, at barrierespidserne sidder godt fast og er egnet til multikanalpipettens mærke og model.
 - Fastgør spidserne med en rullende bevægelse for at sikre, at alle spidser sidder lige godt fast.
 - Opsug i en vinkel på 90° med lige volumenniveauer af væske på tværs af alle spidser.
 - Bland alle komponenter efter levering ved at pipettere reaktionsblandingen op og ned.
 - Efter dispensering skal det sikres, at væske dispenseres fuldt ud fra alle spidser.
- Sørg for at bruge udstyr specificeret til analysen og indstille programmerne som anvist.
- Angivne temperaturer for termocykleren og mikroprøveinkubatoren indikerer reaktionstemperaturen, ikke nødvendigvis den temperatur, der er angivet for udstyret.

Analyse

- Undgå krydskontaminering.
 - Følg korrekt laboratoriepraksis ved håndtering af prøver og reagenser.
 - Brug nye engangslaboratorieartikler og pipettespidser mellem hver prøve og mellem dispensering af reagenser.
 - Brug aerosolbestandige spidser for at reducere risikoen for krydskontaminering.
 - Brug en ensrettet arbejdsgang, når du bevæger dig fra områder før amplifikation til områder efter amplifikation.
 - Håndtér og åbn kun én indeksprimer ad gangen. Luk hvert indekstrør umiddelbart efter brug. Ekstra hætter følger med sættet.
 - Skift handsker ofte og hvis de kommer i kontakt med indeksprimere eller prøver.
 - Fjern ubrugte indeksprimerrør fra arbejdsområdet.
 - Reagenser må ikke returneres til opbevaringsrør efter brug med et striprør, en skål eller et reservoir.
 - Bland prøver med en pipette, og centrifuger pladen, hvor det er angivet.
 - Brug en mikroladeomryster. Bland ikke pladerne på vortexblander.
- Byt ikke om på analysekomponenter fra forskellige reagenssætpartier. Reagenssætpartier er identificeret på mærkatet på æsken til reagenssættet og på masterpartiets ark.
- Korrekt laboratoriepraksis kræves for at forhindre, at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering, prøver og biblioteker. Kontaminering med nuklease og PCR-produkter kan medføre unøjagtige og upålidelige resultater.
- Korrekt pladetype kræves for optimal analysegydeevne og opbevaring. Sørg for at følge instruktionerne til overførsel af plade i [Brugsvejledning på side 36](#).
- Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan medføre fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat bibliotekskvalitet.

- Fortsæt straks til næste trin, medmindre der er angivet et sikkert stoptidspunkt i [Brugsvejledning på side 36](#).
- Opbevar analysereagenserne og -bestanddelene ved de specificerede temperaturer i de angivne områder til anvendelse før-amplifikation og efter-amplifikation.
- Opbevar ikke reagenser på et frostfrit opbevaringssted eller i rum i køleskabsdøren.
- Reagenser, der indeholder perler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.
- Brug ikke reagenser, der har været opbevaret forkert.
- Afvig ikke fra de procedurer, der er angivet for blanding og håndtering for hver reagens. Utilstrækkelig blanding eller for lang tids blanding på vortexblander kan medføre mislykkede prøveresultater.
- FSM, SSM, ERA1-B og TCB1 kan have produktrelaterede partikler. Følg retningslinjerne for håndtering af hvert reagens. Efter udførelse af FSM- og SSM-blandingstrinene vil de resterende hvide produktrelaterede partikler ikke påvirke ydeevnen.
- Klargør friske masterblandinger, og kassér den resterende volumen efter brug.
- Klargør altid frisk 80 % ethanol med RNase/DNase-free water til vasketrinnene. Ethanol kan absorbere vand fra luften, hvilket kan påvirke resultaterne. Kassér 80 % ethanol efter brug i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale forordninger.
- Overfør den angivne volumen af eluat. Overførsel af mindre end den angivne volumen af eluat under elueringstrinnene kan påvirke resultaterne.
- Brug følgende retningslinjer for ultrasonikatorer. Sørg for at følge producentens instruktioner.
 - Tilføj gDNA til ultrasonikatorrøret langsomt for at undgå, at der dannes bobler. Overdrevet mange bobler eller en luftlomme i røret til afklipping kan føre til ufuldstændig fragmentering.
 - Dispensér til ultrasonikatorrør langsomt, og undgå at sprøjte.
 - For at undgå væskeforskydning og tab af prøve må pipettespidsen ikke indsættes i bunden af ultrasonikatorrøret ved fjernelse af fragmenteret DNA.
- Pipettér ikke mindre end 2 µl prøveinput.
- Brug ikke en skål til at dispensere reagenser i trin, der kræver tilførsel af mindre end 10 µl materiale til hver prøvebrønd.
- Brug en pipette med fin spids ved overførsel af fragmenterede gDNA-prøver fra ultrasonikatorrørene til biblioteksklargøring (LP)-pladen.
- SUA1- og UMI-adaptore må ikke kombineres.
- Brug SUA1-adaptore sammen med RNA-prøver.
- Brug UMI-adaptore sammen med DNA-prøver.
- Tildel forskellige indeksprimere til hver biblioteksprøve for unik identifikation af hvert bibliotek, når det samles til sekventering på en enkelt gennemstrømningscelle.
- CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i det samme bibliotek.

- Uoverensstemmelser mellem prøver og indeksprimere medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve. Indtast prøve-ID'er, og tildel indekser i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul, inden du begynder klargøring af biblioteket. Registrér prøve-ID'er, indeksering og retning for pladebrønd som reference under klargøring af bibliotek.
- For biblioteker afledt fra RNA-prøver skal der kun bruges UPxx-indekser.
- For biblioteker afledt fra DNA-prøver skal der bruges UPxx-indekser eller CPxx-indekser.
- Sekventér maksimalt 8 RNA-biblioteker og 8 DNA-biblioteker per gennemstrømningscelle. Sekventér mindst tre biblioteker. Følg retningslinjerne i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 33](#).
- Efter bindingstrinnene i [Indfang Targets One på side 57](#) og [Indfang Targets Two på side 61](#) skal du med det samme fortsætte til vasketrinnene for at forhindre, at perlepelleten tørrer.
- Under vasketrinnene skal alt 80 % ethanol fjernes fra bunden af brøndene. Resterende ethanol har vist sig at påvirke resultaterne.
- Følg de angivne antal vaske specificeret i [Brugsvejledning på side 36](#).
- Under proceduren [Normalisering af biblioteker på side 68](#) skal bibliotekets perlepellet resuspenderes meget omhyggeligt for at opnå ensartet clusterdensitet på flowcellen.
- Alle alvorlige hændelser, der er relateret til dette produkt, skal omgående indberettes til Illumina og til de kompetente myndigheder i brugerens og patientens opholdsland.

Procedurenoter

- TSO Comprehensive (EU)-arbejdsgangen kan udføres i henhold til følgende tidsplan:
 - Dag 1: cDNA-syntese fra RNA-prøver, DNA-fragmentering af gDNA-prøver, klargøring af bibliotek og begynd hybridisering natten over (første).
 - Dag 2: Berigelse, normalisering af berigede biblioteker og overførsel af biblioteker på NextSeq 550Dx-instrument.Hvis det ikke er muligt at udføre TSO Comprehensive (EU)-arbejdsgangen i henhold til denne tidsplan, er der angivet adskillige sikre stoptidspunkter gennem hele protokollen. Fortsæt straks til næste trin, medmindre der er angivet et sikkert stoptidspunkt i protokollen.
- Biblioteker afledt fra RNA- og DNA-prøver kan klargøres på samme tid i separate brønde.
- Tabeller til klargøring af masterblanding omfatter overskud af volumen for at sikre, at der er tilstrækkeligt volumen til det antal prøver, der behandles.
- Brug vand af molekylær kvalitet, der er fri for nukleaser.
- Efter tilføjelse af reagens skal spidsen renses ved at opsuge og dispensere én gang i den relevante brønd i pladen, medmindre andet er angivet i proceduren.
- Stuetemperatur er defineret som 15 °C til 30 °C.

- Reagenser, prøver og biblioteker skal holdes afkølede under visse trin i brugsanvisningen. Dette defineres som opbevaring på is eller tilsvarende.

Termocyklerens programmer

- Programmér termocyklerens programmer på udstyr til anvendelse før og efter amplifikation, inden protokollen startes.
- Sørg for, at PCR-pladerne passer nøjagtigt i termocyklere.
- Brug plader anbefalet af termocyklerens producent.

Påføring og fjernelse af forsegling på pladen

- Forsegl altid pladerne med en ny, selvklæbende pladeforsegl. Forseglinger må ikke genbruges.
- Pladen forsegles ved på sikker vis at påføre det selvklæbende overtræk med en kile eller rulle til forsegling.
- Forsegl altid 96-brønds pladen med ny, selvklæbende pladeforsegl, inden følgende trin i protokollen udføres.
 - Trin til omrystning af plade
 - Centrifugeringstrin
 - Termocyklertrin
 - Hybridiseringer
 - Langtidsopbevaring
- Sørg for, at kanterne og brøndene er forseglede for at reducere risikoen for krydskontaminering og fordampning.
- Placer pladen på en jævn overflade, inden forseglingen fjernes forsigtigt.
- Centrifuger ved $280 \times g$ i et minut, inden forseglingen fjernes, hvis der observeres væske eller kondensdannelse på forseglingen eller brøndenes sidevægge.
- Brug selvklæbende pladeforseglere, der er effektive ved -20 °C til 100 °C og egnet til PCR-plader med skørt eller halvskørt.

Udstyr

- Sørg for, at laboratoriepersonalet er bekendt med producentes instruktioner for drift og vedligeholdelse af udstyret, inden analysen startes.

Pladetype og overførsler af plade

- Korrekt pladetype kræves for optimal analysedeevne og opbevaring.
- Ved overførsel af volumener mellem plader skal den specificerede volumen fra hver brønd i en plade overføres til den tilsvarende brønd i destinationspladen.

- Multikanalpipetter kan anvendes ved overførsel af prøver mellem rørstrips eller plader.
- Brug følgende retningslinjer ved omrystning af plader.
 - Brug en pladeomryster til at omryste pladerne. Bland ikke pladerne på vortexblander.
 - Omryst PCR-plader ved 1200 o/min.
 - Omryst MIDI-plader ved 1800 o/min.
 - Følg producentens instruktioner for at sikre, at pladeomrysteren holder pladen sikkert.

Centrifugering

- Når instruktionerne i protokollen indikerer, at der skal centrifugeres kortvarigt, skal der centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut.
- Centrifuger ved $280 \times g$ i 1 minut, hvis der observeres væske på forseglingen eller siderne af brønden.

Håndtering af reagenser

- Luk alle reagensrør tæt til umiddelbart efter brug for at begrænse fordampning og forhindre kontaminering.
- Sæt reagenserne tilbage ved de angivne opbevaringstemperaturer, når der ikke længere er behov for dem i en procedure.
- Følg reagensklargøringen, der går forud for hvert procedureafsnit i [Brugsvejledning på side 36](#).
- Sørg for, at klargøre den påkrævede volumen af masterblanding, elueringsblanding og 80 % ethanol til det antal prøver, du behandler.
- Volumener angivet i tabeller over masterblanding og opløsning indeholder overskud. Overskud af volumen beregnes som følger.
 - [Tabel 14](#)
 - Volumen af FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antal prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - Volumen af FSM = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{antal prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - [Tabel 21](#)
 - Volumen af ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,20)$.
 - Volumen af ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,20)$.
 - [Tabel 29](#)
 - Volumen af EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabel 30](#)
 - Volumen af EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabel 36](#)
 - Volumen af LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (2,0)$.

- Volumen af LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (2,0)$.
- [Tabel 37](#)
- Volumen af EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,25)$.
- Volumen af HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,25)$.

Adaptersæt

- TSO Comprehensive (EU)-analysen omfatter SUA1- og UMI-adaptore.
- SUA1-adaptore er beregnet til brug sammen med RNA-prøver. Ikke egnet til brug sammen med DNA-prøver.
- UMI-adaptore er beregnet til brug sammen med DNA-prøver. Ikke egnet til brug sammen med RNA-prøver.

Håndtering af perler

- Tre typer perler er inkluderet i TSO Comprehensive (EU)-analysen (SPB, SMB og LNB1). Sørg for, at den korrekte perletype anvendes under proceduren.
- Foretag det korrekte antal vaske for hver perletype.
- Sørg for, at perlerne er ved stuetemperatur inden brug.
- Bland perlerne i 1 minut før brug for at sikre homogenitet.
- Brug følgende retningslinjer, når perlerne blandes med en pipette:
 - Brug en pipette og spidsstørrelse, der passer til den volumen, du blander.
 - Justér volumenindstillingen til ca. 50-75 % af prøvevolumenen.
 - Pipetter langsomt uden at slippe pressestempet.
 - Undgå at sprøjte, og dannelse af bobler.
 - Placer pipettespidsen over pelleten, og dispensér direkte ind i pelleten for at frigive perler fra brønden eller røret.
 - Sørg for, at perlepelleten er helt opløst. Opløsningen bør være mørkebrun og have en homogen konsistens.
 - Vurdér, om der er en perlepellet til stede. Aspirér forsigtigt hele brøndens perleopløsning i spidsen, og se på bunden af brøndene.
- Hvis perlerne suges op i pipettespidsen under trinnene til magnetisk separation, skal du dispensere perlerne tilbage på pladebrønden på det magnetiske stativ. Vent, indtil væsken er klar (ca. 2 minutter), før du fortsætter til næste trin i proceduren.
- Når perlerne vaskes:
 - Brug den anbefalede magnetiske holder til pladen.
 - Dispensér væske direkte på perlepelleten, således at perlerne på brøndens sider bliver våde.
 - Bibehold pladen på det magnetiske stativ, indtil proceduren angiver, den skal fjernes.

- Ryst ikke pladen, mens den er på det magnetiske stativ.
- Forstyr ikke perlepelleten, mens den er på det magnetiske stativ.
- Når perlerne vaskes, eller supernatanten fjernes, skal pipettespidserne vinkles i bunden af brøndene for at undgå, at der dannes et vakuum, og at opløsningen trækkes ind i pipettespidsernes filtre.

Antal biblioteker og valg af indekser

Planlæg antallet af prøvebiblioteker og prøveindekser for sekventeringskørslen inden kørselskonfiguration. De følgende retningslinjer for antal prøver omfatter positive kontroller, men indeholder ikke negative kontroller/kontroller uden skabelon (NTC'er). NTC'er skal føjes til den planlagte kørsel som en ekstra prøve.

For TSO Comprehensive (EU) følges retningslinjerne i [Tabel 6](#) og [Tabel 7](#) for at bestemme antallet af RNA- og/eller DNA-biblioteker, når der sekventeres på én gennemstrømningscelle. Se [Tabel 6](#), hvis du sekventerer RNA- eller DNA-biblioteker separat. Se [Tabel 7](#), hvis du sekventerer RNA- og DNA-biblioteker på den samme gennemstrømningscelle.

Tabel 6 Sekventering af RNA- eller DNA-biblioteker

Bibliotekstype	Minimum*	Maksimum*
Kun RNA	3	16
Kun DNA	3	8

*NTC'er bidrager ikke til pleksiteten.

Tabel 7 Sekventering af RNA- og DNA-biblioteker på samme gennemstrømningscelle

Bibliotekstype	Minimum*	Maksimum*
RNA	3	8
DNA	3	8

*NTC'er bidrager ikke til pleksiteten.

For optimal udnyttelse af reagens ved sekventering af DNA- og RNA-biblioteker med TSO Comprehensive (EU) på NextSeq 550Dx-instrument skal der sekventeres 8 RNA-biblioteker og 8 DNA-biblioteker per gennemstrømningscelle.

Indeksprimere identificerer hver prøve unikt, således at hvert bibliotek kan samles til sekventering på én gennemstrømningscelle. Kompatible indeksskombinationer vises på skærmen Create Run (Opret kørsel) under kørselskonfiguration i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul. Tilsæt indeksprimere til hvert prøvebibliotek under biblioteksklargøring. *Brug forskellige indeksprimerblandinger til hvert prøvebibliotek.*

Sørg for, at de indeksprimere, du bruger med prøverne, matcher de indekser, du valgte til analyse med Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul. *Uoverensstemmelser medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve.*

TSO Comprehensive (EU) analysen indeholder to typer indekser.

- **UPxx-indekser** – Brug UPxx-indekser til biblioteker afledt fra RNA- eller DNA-prøver.
- **CPxx-indekser** – Brug CPxx-indekser til biblioteker afledt fra DNA-prøver. Brug ikke CPxx-indekser til biblioteker afledt fra RNA eller ved sekventering af kun tre DNA-biblioteker.

Følgende kræves, hvis der kun sekventeres tre biblioteker:

- Alle bibliotekerne skal være DNA eller RNA.
- Brug ikke CPxx-indekssæt.
- Der kræves et af de følgende UPxx-indekssæt for at give tilstrækkelig diversitet:
 - UP01, UP02 og UP03
 - UP04, UP05 og UP06
 - UP07, UP08 og UP09
 - UP10, UP11 og UP12

Det første bibliotek tildeles f.eks. UP01, det andet bibliotek UP02 og det tredje bibliotek UP03.

TruSight Oncology Kontroller

TSO Comprehensive (EU) kræver TruSight Oncology-kontroller, som består af TruSight Oncology DNA-kontrollen og TruSight Oncology RNA-kontrollen som positive kontroller. Inkluder TruSight Oncology DNA-kontrollen for hver DNA-sekventeringskørsel og TruSight Oncology RNA-kontrollen for hver RNA-sekventeringskørsel i et givet, klargjort bibliotek (inkluder også kontroller for kombinerede DNA- og RNA-kørsler). Der klargøres en unik, positiv kontrol for hver planlagt sekvenskørsel. Der henvises til Indlægsseddel til TruSight Oncology Controls (dokumentnr. 200009919) for yderligere oplysninger.

Den positive kontrolinputmængde er 40 ng for DNA og RNA.

Inkluder den relevante NTC i hver RNA- og DNA-biblioteksklargøring. NTC'en sekventeres gentagne gange i ét klargjort bibliotek. Følg disse retningslinjer for TruSight Oncology-kontroller:

- Klargør biblioteker fra positive kontroller og kontroller uden skabelon på samme måde som prøver.
- Brug TEB til DNA NTC.
- Brug DNase/RNase-frit vand til RNA NTC'en.
- De positive kontroller er inkluderet i maksimumskravet til biblioteket.
- NTC'erne er ikke inkluderet i minimumskravet til biblioteket.
- Brug NTC'ens UP-indekser ved sekventering af kun 3 biblioteker.
- Da NTC'en sekventeres gentagne gange, kan de valgte indekser for denne kontrol ikke gentages i det klargjorte bibliotek.

Følgende tabeller viser eksempler på pladeindretninger til klargøring af bibliotek. Hver nummereret kolonne repræsenterer en enkelt sekventeringskørsel. Når DNA- og RNA-biblioteker sekventeres sammen, repræsenterer hvert sammenhængende sæt af kolonner en enkelt sekventeringskørsel (f.eks. kolonne 1 og kolonne 7). NTC'en sekventeres for hver kolonne eller hvert sæt af kolonner.

Tabel 8 Klargjort bibliotek i en enkelt kørsel inklusive seks patientprøver

	1	2	3	4	5	6	7
A	Positiv DNA-kontrol	tom	tom	tom	tom	tom	Positiv RNA-kontrol
B	DNA 1	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 1
C	DNA 2	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 2
D	DNA 3	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 3
E	DNA 4	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 4
F	DNA 5	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 5
G	DNA 6	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 6
H	DNA NTC	tom	tom	tom	tom	tom	RNA NTC

Tabel 9 Klargjort bibliotek i tre kørsler inklusive 20 patientprøver

	1	2	3	4	5	6	7
A	Positiv DNA-kontrol	Positiv DNA-kontrol	Positiv DNA-kontrol	tom	Positiv RNA-kontrol	Positiv RNA-kontrol	Positiv RNA-kontrol
B	DNA 1	DNA 7	DNA 14	tom	RNA 1	RNA 7	RNA 14
C	DNA 2	DNA 8	DNA 15	tom	RNA 2	RNA 8	RNA 15
D	DNA 3	DNA 9	DNA 16	tom	RNA 3	RNA 9	RNA 16
E	DNA 4	DNA 10	DNA 17	tom	RNA 4	RNA 10	RNA 17
F	DNA 5	DNA 11	DNA 18	tom	RNA 5	RNA 11	RNA 18
G	DNA 6	DNA 12	DNA 19	tom	RNA 6	RNA 12	RNA 19
H	DNA NTC	DNA 13	DNA 20	tom	RNA NTC	RNA 13	RNA 20

Brugsvejledning

En oversigt over TSO Comprehensive (EU)-arbejdsgangen vises i [Figur 1](#) og [Figur 2](#).

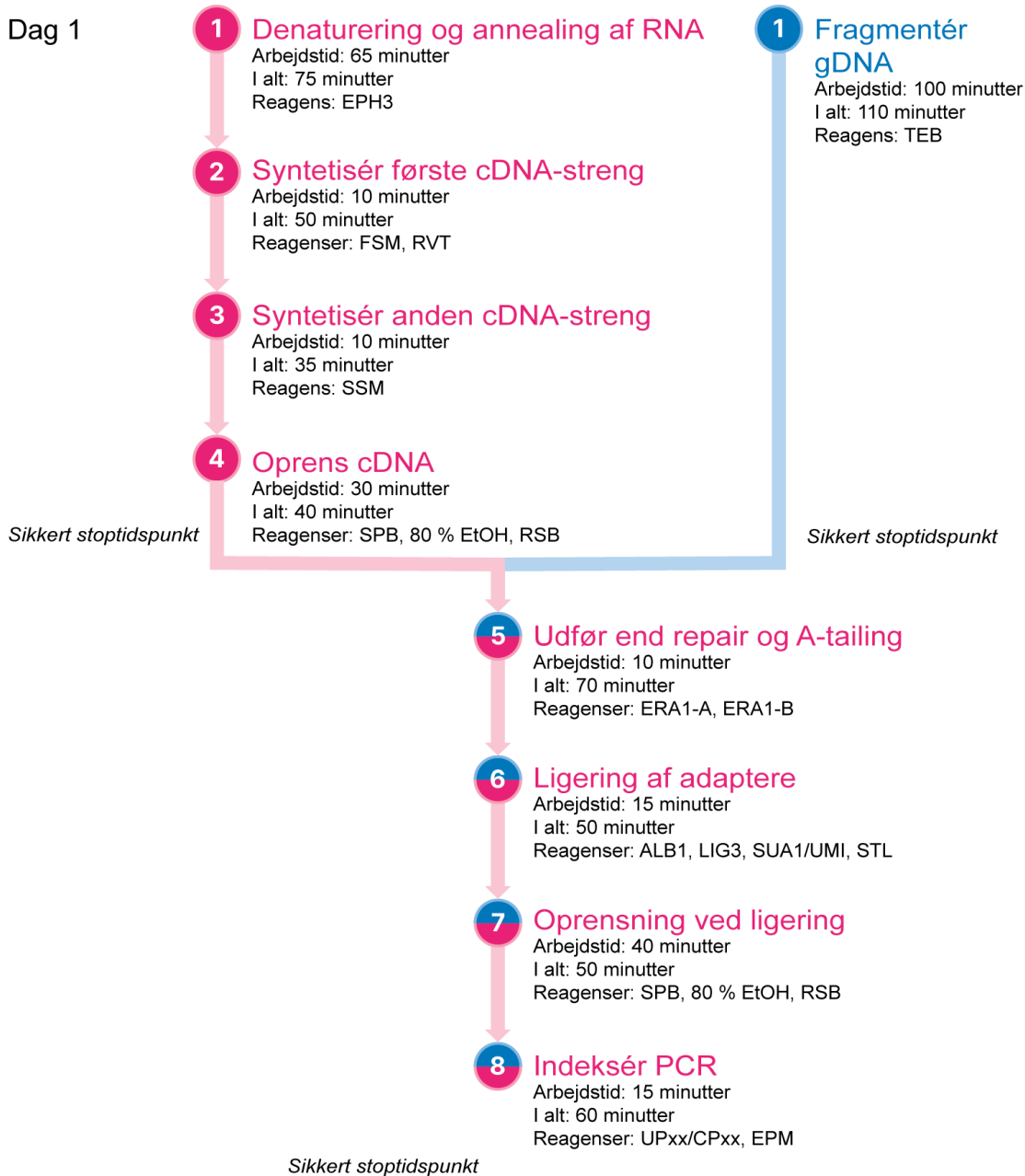
Arbejdsgang til klargøring af bibliotek

[Figur 1](#) illustrerer arbejdsgangen til klargøring af bibliotek for TSO Comprehensive (EU). Biblioteker fra RNA- og DNA-prøver kan klargøres på samme tid i separate brønde. Positive kontroller og kontroller uden skabelon skal behandles på samme måde som prøver. Sikre stoptidspunkter er markeret mellem trinnene.

Før protokollen startes, skal kørsels- og prøveoplysninger indtastes i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodul. Se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang* (dokumentnr. 200008661).

Figur 1 TSO Comprehensive (EU) Arbejdsgang (del 1)

Dag 1



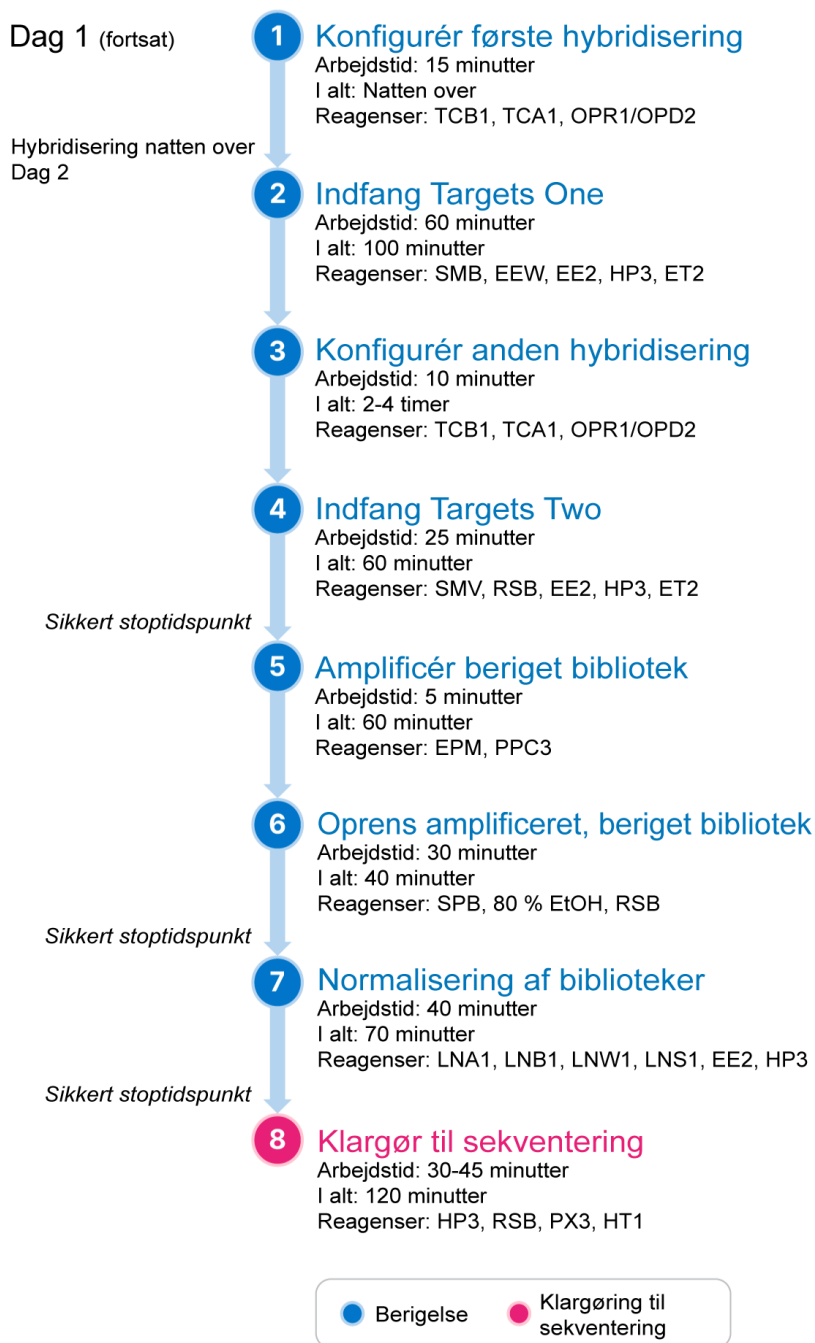
● cDNA ● Afklippet DNA

* Arbejdstider og tider i alt er omtrentlige.

Arbejdsgang for berigelse

Figur 2 illustrerer arbejdsgangen for berigelse for TSO Comprehensive (EU). Sikre stoptidspunkter er markeret mellem trinnene.

Figur 2 TSO Comprehensive (EU) Arbejdsgang (del 2)



Programmer termocykler

Inden analysen startes, skal følgende programmer gemmes på termocykler før og efter amplifikation.

Tabel 10 Programmer på termocykler før amplifikation

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Denaturering og annealing af RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C i 5 minutter • 4 °C i 1 minut • Opretholdes ved 4 °C
Syntetiser første cDNA-streng	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C i 10 minutter • 42 °C i 15 minutter • 70 °C i 15 minutter • 4 °C i 1 minut • Opretholdes ved 4 °C
Syntetiser anden cDNA-streng	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C i 25 minutter • 4 °C i 1 minut • Opretholdes ved 4 °C

BEMÆRK Hvis lågets temperatur for 2ndSS ikke kan indstilles til 30 °C, skal du slå funktionen forvarmning af låg fra.

Tabel 11 Programmer på termocykler efter amplifikation

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Indeksér PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 cyklusser med: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • Hold ved 10 °C
Foretag første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • Opretholdes ved 57 °C i 8 til 24 timer

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Foretag anden hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C i 10 minutter 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder - Opretholdes ved 57 °C i 1,5 til 4 timer
Amplificér beriget bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C i 30 s 18 cyklusser med: 98 °C i 10 s 60 °C i 30 s 72 °C i 30 s 72 °C i 5 min - Hold ved 10 °C

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.



FORSIGTIG

Alle procedurer i arbejdsgangen kræver et RNase/DNase-frit miljø.

1. Dekontaminér arbejdsområderne grundigt med et RNase/DNase-inhiberende rensemiddel.
2. Sørg for, at termocyklerens programmer til før amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 39](#).
3. Følg producentens instruktioner for at konfigurere ultrasonikatorens.
4. Hvis der udelukkende behandles DNA-prøver, skal du fortsætte direkte til [Fragmentér gDNA på side 46](#).
5. Hent RNA-kontrollerne fra opbevaring.
6. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (delnummer 20031127)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
EPH3	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Denaturering og annealing af RNA
FSM	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Syntetiser første cDNA-streng
RVT	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Syntetiser første cDNA-streng
SSM	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Syntetiser anden cDNA-streng

Tabel 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (køl) (delnummer 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SPB (lysegrønt mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Oprens cDNA
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Oprens cDNA

Denaturering og annealing af RNA

Denne proces denaturerer oprenset RNA og primere med vilkårlige hexamerer ved klargøring til cDNA-syntese.

Klargøring

- Klargør følgende reagenser.
 - EPH3 – Sæt til side.
 - FSM – Bland på vortexblander. Centrifuger kortvarigt, og bland ved pipettering. Reagenset kan indeholde hvide produktrelaterede partikler. Der kræves ingen brugerhandling. Der er ingen indvirkning på produktdeevnen.
 - RVT – Centrifuger kortvarigt, og bland ved pipettering. Hold afkølet.

BEMÆRK RVT er en viskøs opløsning. Minimér bobledannelse under pipettering.

- Kombiner følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at klargøre en FSM + RVT-masterblanding.

Tabel 14 FSM + RVT-masterblanding*

Bestanddel i masterblandingen	4 biblioteker (µl)	8 biblioteker (µl)	16 biblioteker (µl)	24 biblioteker (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 31](#) for beregninger.

- Bland 10 gange ved pipettering.
- Hold FSM + RVT-masterblandingen afkølet indtil [Syntetiser første cDNA-streng på side 42](#).

Fremgangsmåde

- Hold ekstraherede RNA-prøver og RNA-kontroller afkølede under optøning. RNA-kontroller skal behandles som prøver i den resterende del af protokollen.
- Hold RNA afkølet, når det ikke er i brug. Se [Krav til prøver på side 24](#) for at kvantificere prøver.
- Bland hver RNA-prøve 10 gange ved pipettering.

4. Brug RNase/DNase-free water til at klargøre 40 ng af hver RNA-prøve i en endelig volumen på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Til RNA-kontroller skal der bruges den koncentration, der er angivet på rørets mærkat.
5. Markér en ny 96-brønds PCR-plade CF (cDNA-fragmenter).
6. Tilføj 8,5 µl af hver RNA-prøve til en unik brønd i CF PCR-pladen.
7. Kontrollér, at prøvepladens layout og indekser for hver prøve svarer til den kørsel, der er planlagt i TSO Comprehensive (EU)-analysemodul under kørselskonfigurationen.
8. Bland EPH3 på vortexblander, og centrifuger kortvarigt.
9. Tilføj 8,5 µl EPH3 til hver prøvebrønd.
10. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.

**FORSIGTIG**

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

11. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
12. Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
13. Placer på termocykleren, og kørsel LQ-RNA-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 39](#).
14. Når prøverne når 4 °C, skal de opretholdes ved denne temperatur i 1 minut. Fortsæt straks til det næste trin.

Syntetiser første cDNA-streng

Denne proces anvendes til reverse transcriptase af RNA-fragmenter, der er aktiveret med vilkårlige hexamerer i første cDNA-streng ved hjælp af reverse transcriptase.

Fremgangsmåde

1. Fjern CF PCR-pladen fra termocykleren.
2. Bland FSM + RVT-masterblandingen 10 gange ved pipettering. Sørg for, at FSM + RVT-blandingen er helt homogen.
3. Tilføj 8 µl FSM + RVT-masterblanding til hver prøvebrønd.
4. Bland 10 gange ved pipettering.
5. Kassér den resterende FSM + RVT-masterblanding.
6. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
7. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
8. Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
9. Placer på en termocykler, og kørsel 1stSS-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 39](#).

10. Når prøverne når 4 °C, skal du straks fortsætte til næste trin.
Prøver af første streng kan opretholdes ved 4 °C i op til 5 minutter.

Syntetiser anden cDNA-streng

Denne proces fjerner RNA-skabelonen og syntetiserer dobbeltstrenget cDNA.

Klargøring

1. Klargør SSM:
 - a. Vend og op ned 10 gange for at blande.
 - b. Centrifuger kortvarigt. Reagenset kan indeholde hvide produktrelaterede partikler. Der kræves ingen handling. Der er ingen indvirkning på produktdeevnen.

Fremgangsmåde

1. Fjern CF PCR-pladen fra termocyklern.
2. Tilføj 25 µl SSM til hver prøvebrønd.
3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
4. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
5. Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
6. Placer på en termocykler, og kørs 2ndSS-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 39](#).
7. Når prøverne når 4 °C, skal de opretholdes ved denne temperatur i et minut, og derefter skal der straks fortsættes til næste trin.

Oprens cDNA

Denne proces bruger SPB til at oprense cDNA fra uønskede reaktionsbestanddele. Perlerne vaskes to gange med frisk 80 % EtOH. cDNA'et elueres med RSB.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - SPB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
2. Klargør 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml konisk rør på følgende måde.

Tabel 15 Forbered frisk 80 % EtOH

Reagens	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker
100 % EtOH, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
4. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BIND1 (cDNA-binding).
5. Dæk til, og sæt til side.
6. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern CF PCR-pladen fra termocykleren.
2. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
3. Tilføj straks 90 µl SPB til hver prøvebrønd i BIND1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale per prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, efter at SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
4. Overfør hele volumen (50 µl) af hver prøve fra CF PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND1 MIDI-pladen.
5. Kassér den tomme CF PCR-plade.
6. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
7. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
8. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
9. Placér BIND1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
10. Hold pladen på det magnetiske stativ. Brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Hold BIND1 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.

3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EtOH fra hver brønd.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluér

1. Fjern BIND1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
3. Tilføj 22 µl RSB til hver prøvebrønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
6. Inkubér ved stuetemperatur i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade PCF (Oprensede cDNA-fragmenter).
Hvis du stopper ved [SIKKERT STOPTIDSPUNKT på side 45](#), skal du bruge en PCR-plade.
9. Overfør 20 µl eluat fra hver prøvebrønd i BIND1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PCF-pladen.
10. Kassér den tomme BIND1 MIDI-plade.
11. Tilføj 30 µl RSB til hver prøvebrønd i PCF-pladen.
12. Bland 10 gange ved pipettering.
13. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PCF-pladen, og opbevar den afkølet.
14. Sæt EPH3, FSM, RVT og SSM tilbage i opbevaring.
15. Hvis du kun behandler prøver afledt af RNA (cDNA) og ikke stopper ved det sikre stoptidspunkt, skal du fortsætte til [Udfør end repair og A-tailing på side 48](#).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal PCF PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

1. Hent DNA-kontroller fra opbevaring.
2. Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (køl) (delnummer 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TEB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Fragmentér gDNA

Fragmentér gDNA

Denne proces fragmenterer gDNA og genererer dsDNA-fragmenter med 3'- eller 5'-overhæng.

Klargøring

1. Følg anbefalingerne i [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25](#) for at kvantificere prøver.
2. Klargør TEB – Vend op og ned, eller bland på vortexblander.

Fremgangsmåde

Klargør pladen

Vælg én af de følgende muligheder for at klargøre pladen:

- gDNA-prøver behandles sammen med cDNA-prøver i PCF MIDI-pladen.
 - a. Markér PCF MIDI-pladen LP (Biblioteksklargøring).
 - b. Hold afkølet, og sæt til side til brug i [Overfør fragmenteret DNA på side 47](#).
- gDNA-prøver behandles sammen med cDNA-prøver, og PCF PCR-pladen fryses.
 - a. Optø PCF PCR-pladen ved stuetemperatur.
 - b. Centrifuger ved $280 \times g$ i 1 minut.
 - c. Bland 10 gange ved pipettering.
 - d. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP (Biblioteksklargøring).
 - e. Overfør alle 50 µl af hver prøve fra PCF PCR-pladen til den tilsvarende brønd i LP MIDI-pladen.
 - f. Kassér PCF PCR-pladen.
 - g. Påfør selvklæbende pladeforsegler, og hold afkølet indtil [Overfør fragmenteret DNA på side 47](#).
- Prøver, der udelukkende indeholder gDNA, behandles.
 - a. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP (Biblioteksklargøring).

Hvis du stopper ved [SIKKERT STOPTIDSPUNKT på side 47](#), skal du bruge en PCR-plade.
 - b. Dæk til, og sæt til side til brug i [Overfør fragmenteret DNA på side 47](#).

Fortynd gDNA

1. Optø gDNA-prøver og DNA-kontroller ved stuetemperatur.
2. Bland hver gDNA-prøve 10 gange ved pipettering.
3. Centrifuger røret kortvarigt for at opsamle små dråber.
4. Vend TEB op og ned, eller bland på vortexblander.
5. Brug TEB til at klargøre hver gDNA-prøve i en endelig volumen på 52 µl. Se følgende tabel for inputmængder og minimumskoncentrationer baseret på prøvetype.

- Analysen kræver en minimum ekstraktionskoncentration for at tillade mindst 40 µl TEB af volumen på 52 µl.
- Ved DNA-kontroller skal du bruge den koncentration, der er angivet på mærkatet på røret.
- For at forhindre prøvetab må der ikke tilføjes mindre end 2 µl prøve ved pipettering til denne fortynding.

Prøvetype	Inputmængde (ng)	Minimumskoncentration (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrol	40	Se rørets mærkat

Fragmentér

1. Tilføj 52 µl til hver gDNA-prøve i en separat brønd i det ultrasoniske rør.



FORSIGTIG

Tilføj gDNA'et til røret langsomt, og sørg for, at der ikke er nogen luftlommer i bunden af røret. Se [Analyse på side 27](#) og producentens instruktioner for at få mere at vide.

2. Registrér retningen på strimlen.
3. Fragmentér gDNA i fragmenter med en ultrasonikator.

Overfør fragmenteret DNA

1. Sørg for, at pladeindretning og indekser for hver prøve svarer til den kørsel, du vælger til analyse med TSO Comprehensive (EU)-analysemodul.
2. Følg instruktionerne fra producenten af ultrasonikatoren for at gendanne prøven.
For visse typer ultrasoniske rør er centrifugering påkrævet for at samle prøven i røret.
3. For hver fragmenteret gDNA-prøve skal du bruge en pipette med fine spidser til at foretage 3 overførsler på 16,7 µl til en tom brønd i LP MIDI-pladen.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP MIDI-pladen.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du påføre en selvklæbende pladeforsegler på LP PCR-pladen og centrifugere ved 280 × g i 1 minut. Opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

Sørg for, at termocyklens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 39](#).

1. Klargør en isspand eller tilsvarende.

2. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (frys) æske (delnummer 20031118)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
ERA1-A	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Udfør end repair og A-tailing
ERA1-B	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Udfør end repair og A-tailing
ALB1	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
LIG3	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Ligering af adaptore
SUA1 (blå hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
UMI (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
STL	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
EPM	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Indeksér PCR

Tabel 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (køl) æske (delnummer 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SPB (lysegrønt mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Oprensning ved ligering
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Oprensning ved ligering

Tabel 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers æske (delnummer 20031120)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
UPxx	-25 °C til -15 °C	Optø de relevante indeksprimerrør ved stuetemperatur.	Indeksér PCR

Tabel 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers æske (delnummer 20031126)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
CPxx	-25 °C til -15 °C	Optø de relevante indeksprimerrør ved stuetemperatur.	Indeksér PCR

Udfør end repair og A-tailing

Denne proces reparerer de overhæng, der stammer fra fragmenteringen, til ender med A-overhæng ved hjælp af en masterblanding til end repair A-tailing (ERA1).

3'- til 5'-exonukleaseaktivitet i denne blanding fjerner 3'-overhæng, og 5'- til 3'-polymeraseaktivitet fylder 5'-overhæng. Under denne reaktion bliver 3'-enderne til A-overhæng for at forhindre, at de ligerer til hinanden under ligationen.

Klargøring

- Forvarm to mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokindsatser som følger.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
- Klargør følgende reagenser.
 - ERA1-A – Centrifuger kortvarigt, og bland derefter ved pipettering. Hold afkølet.
 - ERA1-B – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
Inspicér for bundfald. Hvis der er bundfald, skal du opvarme røret til 37 °C og derefter blande ved pipettering, indtil bundfaldet opløses.

- Klargør ERA1-masterblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 21 ERA1-masterblanding*

Bestanddel i masterblandingen	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 31](#) for beregninger.

- Pipetter langsomt 10 gange for at sikre homogenitet, og centrifuger derefter kortvarigt. Hold ERA1-masterblanding afkølet.
- Vælg én af de følgende tre muligheder for at klargøre pladen:
 - Hvis prøverne er i en MIDI-plade, klargøres som følger.
 - Markér MIDI-pladen LP2 (Biblioteksklargøring 2).
 - Hvis nogle prøver er i separate MIDI-plader, skal alle prøver overføres til separate brønde i samme MIDI-plade i henhold til pladeindretningen.
 - Hvis pladen er frosset, klargøres på følgende måde.
 - Optø PCF PCR-pladen eller LP PCR-pladen ved stuetemperatur.
 - Centrifuger pladen ved 280 × g i 1 minut.
 - Bland 10 gange ved pipettering.
 - Markér en ny 96-brønnds MIDI-plade LP2 (Biblioteksklargøring 2).
 - Overfør alle 50 µl af hver prøve fra PCF PCR-pladen eller LP PCR-pladen til den tilsvarende brønd i LP2 MIDI-pladen.
 - Kassér PCF PCR- eller LP PCR-pladen.

Fremgangsmåde

1. Tilføj 10 µl ERA1-masterblanding til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
2. Kassér den resterende ERA1-masterblanding.
3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
4. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
5. Inkubér i en forvarmet mikroprøveinkubator ved 30 °C i 30 minutter.
6. Overfør straks til en anden, forvarmet mikroinkubator.
7. Inkuber ved 72 °C i 20 minutter.
8. Hold LP2 MIDI-pladen afkølet i 5 minutter.

Ligering af adaptore

Denne proces ligerer adaptore til enderne af cDNA- og/eller gDNA-fragmenterne.

TSO Comprehensive (EU)-analysen omfatter SUA1- og UMI-adaptore.

- Brug SUA1-adaptore sammen med RNA-prøver.
- Brug UMI-adaptore sammen med DNA-prøver.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - ALB1 – Bland på vortexblander i mindst 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - LIG3 – Centrifuger kortvarigt, og bland derefter ved pipettering. Hold afkølet.
 - SUA1 – Bland på vortexblander i mindst 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - UMI – Bland på vortexblander i mindst 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - STL – Sæt til side til brug i proceduren.

Fremgangsmåde

1. Fjern LP2 MIDI-pladen fra is eller tilsvarende.
2. Tilføj 60 µl ALB1 til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen. ALB1 er en viskøs opløsning. Pipetter langsomt for at minimere bobledannelse.
3. Tilføj 5 µl LIG3 til hver prøvebrønd.
4. Tilføj adaptore på følgende måde.
Kombinér *ikke* forskellige typer adaptore.
 - **[RNA-prøvebrønde]** – Tilføj 10 µl SUA1 (blå hætte) til hver prøve afledt fra RNA.
 - **[DNA-prøvebrønde]** – Tilføj 10 µl UMI (hvid hætte) til hver prøve afledt fra DNA.

5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsagl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Inkubér ved stuetemperatur i 30 minutter.
8. Bland STL på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
9. Tilføj 5 µl STL til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
10. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsagl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
11. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.

Oprensning ved ligering

Denne proces bruger SPB til at oprense de adapterligerede cDNA- eller gDNA-fragmenter og fjerner uønskede produkter. Perlerne vaskes to gange med frisk 80 % ethanol. De adapterligerede perler elueres med RSB.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - SPB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
2. Klargør 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml konisk rør.

Tabel 22 Klargør frisk 80 % ethanol

Reagens	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % EtOH, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
4. Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
2. Tilføj straks 112 µl SPB til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale per prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, efter at SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.

3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
4. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
5. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
6. Placér LP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder i 10 minutter.
7. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Bibehold LP2 MIDI-pladen på det magnetiske stativ, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver prøvebrønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.
3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EtOH fra hver brønd.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluér

1. Fjern LP2 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
2. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
3. Tilføj 27,5 µl RSB til hver prøvebrønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
6. Inkubér ved stuetemperatur i 2 minutter.
7. Placér LP2 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade LS (Biblioteksprøver).
9. Overfør 25 µl af hvert eluat fra LP2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i LS PCR-pladen.
10. Kassér den tomme LP2 MIDI-plade.

Indeksér PCR

I dette trin amplificeres biblioteksfragmenter ved hjælp af primere, der tilføjer indekssekvenser til multipleksering af prøve. Det resulterende produkt indeholder det komplette bibliotek af cDNA- og/eller DNA-fragmenter flankeret af adaptore, der kræves til clustergenerering.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - EPM – Hold afkølet.
 - UPxx – Bland på vortexblander, og centrifuger kortvarigt. UPxx er den indeksprimer, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.
 - CPxx – Bland på vortexblander, og centrifuger kortvarigt. CPxx er den indeksprimer, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.
2. Sørg for, at indekser for hver prøve matcher den kørsel, der blev planlagt i TSO Comprehensive (EU)-analysemodul under kørselskonfigurationen. Sørg for, at følge instruktionerne vedrørende valg af indeks i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 33](#).



FORSIGTIG

Uoverensstemmelser mellem prøver og indeksprimere medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve.

Fremgangsmåde

1. Tilføj 5 µl af den relevante indeksprimer (UPxx eller CPxx) til den tilsvarende prøvebrønd i LS PCR-pladen i henhold til de indekser, der blev valgt.



FORSIGTIG

Håndtér og åbn kun ét indeksprimerrør ad gangen. Luk hvert indekstrør med et nyt låg umiddelbart efter brug. Kombinér ikke indeksprimere.

2. Bland EPM på vortexblander i 5 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Tilføj 20 µl EPM til hver prøvebrønd.
4. Påfør selvkæbende forsegl på LS PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
5. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
6. Sæt reagenser til brug præ-amplifikation tilbage i opbevaring.



FORSIGTIG

Udfør alle efterfølgende trin i et område, der anvendes efter amplifikation, for at forhindre overførsel af amplifikationsprodukt.

7. Centrifuger LS PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
8. Placer på den forprogrammerede termocykler til anvendelse efter amplifikation, og kørsel I-PCR-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 39](#).
Hvis du fortsætter med [Konfigurer første hybridisering på side 55](#), skal du følge instruktionerne til optøning af reagenser i trinnene Klargør protokol.

9. Når I-PCR-programmet er færdigt, skal LS PCR-pladen centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut.
10. Markér pladen ALS (Amplificerede biblioteksprøver).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ALS PCR-pladen opbevares ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i op til 30 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til hybridisering natten over.

1. Sørg for, at termocyklerens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 39](#).
2. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Konfigurér første hybridisering

Tabel 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys) æske (delnummer 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TCA1	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurér første hybridisering

Tabel 25 TruSight Oncology Comp Content Set æske (delnummer 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPR1 (rød hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurér første hybridisering
OPD2 (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurér første hybridisering

Konfigurér første hybridisering

Under denne proces hybridiserer en pulje af oligoer til cDNA-biblioteker, og en pulje af oligoer hybridiserer til gDNA-biblioteker klargjort i [Indeksér PCR på side 52](#). Berigelse af målrettede regioner kræver to hybridiseringstrin. I den første hybridisering hybridiserer oligoer til cDNA- og/eller gDNA-biblioteker natten over (8 til 24 timer).

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - TCB1 – Opvarm røret ved 37 °C i 5 minutter. Bland på vortexblander i 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPR1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
2. Hvis ALS PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og centrifugeres ved 280 × g i 1 minut. Bland ved pipettering.

3. Markér en ny 96-brønds PCR-plade HYB1 (Hybridisering 1).

Fremgangsmåde

1. Overfør 20 µl af hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-pladen til den tilsvarende brønd i HYB1 PCR-pladen.
2. Påfør selvklæbende pladeforsegler til ALS PCR-pladen, og sæt den til side.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
3. Inspicér TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
4. Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
5. Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
6. Tilføj prober.
Kombiner *ikke* forskellige typer af prober. Tilføj kun ét probesæt pr. brønd.
 - **[RNA-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPR1 (rødt låg) til hvert bibliotek afledt fra RNA.
 - **[DNA-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPD2 (hvidt låg) til hvert bibliotek afledt fra DNA.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til HYB1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
8. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
9. Placér på termocykler, og kørs HYB1-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 39](#).
10. Hybridiser ved 57 °C i minimum 8 timer og maksimum 24 timer.
11. Sæt hybridiseringsreagenser tilbage i opbevaring.
12. Opbevar ALS PCR-pladen ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

Ved starten på dag 2 tages reagensrørene ud af æsken, og instruktionerne til optøning følges.

Tabel 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SMB (mørkeblåt mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two
ET2	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two Normalisering af biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Konfigurer anden hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Indfang Targets Two Oprens amplificeret, beriget bibliotek

Tabel 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys) æske (delnummer 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
EE2	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two Normalisering af biblioteker
EEW	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Indfang Targets One
TCA1	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer anden hybridisering

Tabel 28 TruSight Oncology Comp Content Set æske (delnummer 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPR1 (rødt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer anden hybridisering
OPD2 (hvidt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer anden hybridisering

Indfang Targets One

Dette trin anvender SMB til at indfangne prober hybridiseret til de målrettede interesseområder. Perlerne vaskes tre gange med EEW. De berigede biblioteker elueres ved hjælp af frisk EE2 + HP3-elueringsblanding og neutraliseres med ET2.

Klargøring

- Forvarm en mikropøveinkubator med MIDI-varmeblokindsats til 57 °C.
- Klargør følgende reagenser.
 - EEW – Bland på vortexblander i 1 minut.
 - EE2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - HP3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - SMB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
Sørg for at bruge **SMB**, og ikke SPB, til denne procedure.

- ET2 – Sæt til side til brug i proceduren.
3. Klargør frisk EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 29 EE2 + HP3-elueringsblanding til Indfang Targets One*

Bestanddel i elueringsblandingen	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 31](#) for beregninger.

4. Bland EE2 + HP3-elueringsblanding, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side for [Eluér på side 59](#) trin.
5. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP1 (Indfang 1).
6. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern HYB1 PCR-pladen fra termocyklern.
2. Centrifuger HYB1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
3. Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
Hvis der er bundfald, eller perlepelleten er til stede, skal du sørge for at nå stuetemperatur, pipettere op og ned for at frigøre pelleten og derefter blande for at resuspendere.
4. Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling for at give tilstrækkeligt materiale per prøve.
5. Kassér eventuelt overskydende materiale efter tilføjelse af SMB til hver prøvebrønd.
6. Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra HYB1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP1 MIDI-pladen.
7. Kassér den tomme HYB1 PCR-plade.
8. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
9. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
10. Inkubér på en forvarmet mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
11. Placér CAP1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
12. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

**FORSIGTIG**

Fortsæt straks til det næste trin ([Vask på side 59](#)). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Fjern CAP1 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
 - b. Tilføj 200 µl EEW til hver brønd.
 - c. Brug en pipette indstillet til 150 µl, og bland ved pipettering mindst 10 gange. Sørg for, at alle perler er resuspenderet.

Sørg for, at der ikke er perlepellets til stede ved forsigtigt at opsuge hele brøndens perleopløsning i spidsen. Efterse visuelt bunden af hver brønd. Hvis der forekommer en perlepellet, skråltil pipettespidsen mod perlepelleten under vasketrinnene for at løsne pelleten. Sørg for, at perlepelleten er helt nedsænket i opløsningen. Opløsningen bør være mørkebrun og have en homogen konsistens.
 - d. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
 - e. Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
 - f. Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
 - g. Inkubér i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
 - h. Placér CAP1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
 - i. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.
3. Vask perlerne en **tredje** gang.
4. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EEW fra hver brønd.

Eluér

1. Fjern CAP1 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
2. Bland frisk EE2 + HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Tilføj forsigtigt 17 µl EE2 + HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
4. Kassér resterende EE2 + HP3-elueringsblanding.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU1 (Eluering 1).
9. Bland ET2 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

10. Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU1 PCR-plade.
11. Overfør forsigtigt 15 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU1 PCR-pladen.
12. Kassér den tomme CAP1 MIDI-plade.
13. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
14. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
15. Sæt EEW tilbage i opbevaring.

Konfigurér anden hybridisering

Dette trin binder målrettede områder af de berigede cDNA- og/eller gDNA-biblioteker med indfangningsprober en ekstra gang. Den anden hybridisering sikrer høj specificitet i de indfangede områder. For at sikre optimal berigelse af bibliotekerne skal der udføres et ekstra hybridiseringstrin ved 57 °C i mindst 1,5 time og højst 4 timer.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - TCB1 – Opvarm røret ved 37 °C i 5 minutter. Bland på vortexblander i 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPR1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Fremgangsmåde

1. Inspicér TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
2. Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i ELU1 PCR-pladen.
3. Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd.
4. Tilføj den samme sonde, der blev brugt under den første hybridisering, til hver brønd. Tilføj kun ét probesæt pr. brønd.
Kombinér *ikke* forskellige typer prober.
 - **[RNA-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPR1 (rødt låg) til hvert bibliotek afledt fra RNA.
 - **[DNA-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPD2 (hvidt låg) til hvert bibliotek afledt fra DNA.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
6. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.

- Placér på termocykler, og kør HYB2-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 39](#).
- Hybridiser ved 57 °C i mindst 1,5 time og højst 4 timer.
- Sæt hybridiseringsreagenser tilbage i opbevaring.

Indfang Targets Two

Dette trin anvender SMB til at indfangne prober hybridiseret til de målrettede interesseområder. Perlerne vaskes én gang med RSB. De berigede biblioteker elueres ved hjælp af frisk EE2 + HP3-elueringsblanding og neutraliseres med ET2.

Klargøring

- Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokindsats til 57 °C.
- Klargør følgende reagenser.
 - EE2 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - HP3 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - SMB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
Sørg for at bruge **SMB**, og ikke SPB, til denne procedure.
 - RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
 - ET2 – Sæt til side til brug i proceduren.
- Klargør frisk EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 30 EE2 + HP3-elueringsblanding til Indfang Targets Two*

Bestandsdel i elueringsblandingen	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 31](#) for beregninger.

- Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt. Sæt til side for [Eluér på side 63](#) trin.
- Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP2 (Indfang 2).
- Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- Fjern ELU1 PCR-pladen fra termocykleren.
- Centrifugér ELU1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.

3. Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
Hvis der er bundfald, eller perlepelleten er til stede, skal du sørge for at nå stuetemperatur, pipettere op og ned for at frigøre pelleten og derefter blande for at resuspendere.
4. Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling for at give tilstrækkeligt materiale per prøve.
5. Kassér eventuelt overskydende materiale efter tilføjelse af SMB til hver prøvebrønd.
6. Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra ELU1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP2 MIDI-pladen.
7. Kassér den tomme ELU1 PCR-plade.
8. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
9. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
10. Inkubér i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
Hvis du fortsætter med [Amplificér beriget bibliotek på side 65](#), skal du følge instruktionerne for optøning af reagenser i afsnittet [Klargør til protokol](#).
11. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
12. Bibehold CAP2 MIDI-pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

**FORSIGTIG**

Fortsæt straks til det næste trin ([Vask på side 62](#)). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

1. Fjern CAP2 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
2. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
3. Tilføj 200 µl RSB til hver brønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
6. Placér pladen på det magnetiske stativ i 2 minutter.
7. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
8. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende RSB fra hver brønd.

Eluér

1. Fjern CAP2 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
2. Bland frisk EE2 + HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Tilføj 22 µl EE2 + HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
4. Kassér resterende EE2 + HP3-elueringsblanding.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU2 (Eluering 2).
9. Bland ET2 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
10. Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU2 PCR-plade.
11. Overfør forsigtigt 20 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU2 PCR-pladen.
12. Kassér den tomme CAP2 MIDI-plade.
13. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
14. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
15. Sæt SMB, EE2, HP3, RSB og ET2 tilbage i opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ELU2 PCR-pladen centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

1. Klargør en isspand eller tilsvarende.
2. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys) æske (delnummer 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PPC3	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Amplificér beriget bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Amplificér beriget bibliotek

Tabel 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SPB (lysegrønt mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Oprens amplificeret, beriget bibliotek
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Oprens amplificeret, beriget bibliotek Klargør til sekventering

Amplificér beriget bibliotek

Dette trin anvender primere til at amplificere berigede biblioteker.

Klargøring

1. Hvis ELU2-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og derefter centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut.

Fremgangsmåde

1. Bland PPC3 på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
2. Tilføj 5 µl PPC3 til hver biblioteksbrønd i ELU2 PCR-pladen.
3. Bland EPM på vortexblander i 5 sekunder, og centrifugér derefter kortvarigt.
4. Tilføj 20 µl EPM til hver biblioteksbrønd.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegl på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
6. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en termocycler, og kørs EL-PCR-programmet.
Se [Programmér termocycler på side 39](#).
Hvis du fortsætter med [Normalisering af biblioteker på side 68](#), skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet [Klargør til protokol](#).
8. Sæt PPC3 og EPM tilbage i opbevaring.

Oprens amplificeret, beriget bibliotek

Dette trin bruger SPB til at oprense de berigede biblioteker fra uønskede reaktionsbestanddele. Perlerne vaskes to gange med frisk 80 % ethanol. Bibliotekerne elueres med RSB.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - SPB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter. Sørg for at bruge **SPB**, ikke SMB til denne procedure.
 - RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
2. Klargør frisk 80 % ethanol i et 15 ml eller 50 ml konisk rør.

Tabel 33 Klargør frisk 80 % ethanol

Reagens	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % EtOH, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
4. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BIND2 (Binding ved oprensning).
5. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern ELU2 PCR-pladen fra termocykleren.
2. Centrifuger ELU2 PCR-pladen ved $280 \times g$ i 1 minut.
3. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
4. Tilføj straks 110 µl SPB til hver biblioteksbrønd i BIND2 MIDI-pladen.
5. Overfør 50 µl af hvert bibliotek fra ELU2 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND2 MIDI-pladen.
6. Kassér den tomme ELU2 PCR-plade.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
8. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
9. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
10. Placer BIND2 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
11. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

Vask

1. Vask perlerne, som følger.
 - a. Hold BIND2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.
3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EtOH fra hver brønd.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluér

1. Fjern BIND2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Vend op og ned, eller brug vortexblander for at blande RSB.
3. Tilføj 32 µl RSB til hver biblioteksbrønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
6. Inkubér ved stuetemperatur i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade PL (Oprensede biblioteker).
9. Overfør 30 µl af hvert eluat fra BIND2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PL PCR-pladen.
10. Kassér den tomme BIND2 MIDI-plade.
11. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen.
12. Sæt SPB og RSB tilbage i opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal PL PCR-pladen centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

1. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys) æske (delnummer 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
LNA1	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
EE2	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker

Tabel 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
LNB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Normalisering af biblioteker Klargør til sekventering
LNW1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Normalisering af biblioteker

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
LNS1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Normalisering af biblioteker

2. Hvis du fortsætter samme dag med [Klargør til sekventering på side 71](#), skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet [Klargør til protokol](#).

Normalisering af biblioteker

Denne proces anvender LNB1 plus additiver (LNA1) til at normalisere mængden af hvert bibliotek for at sikre en ensartet biblioteksrepræsentation i bibliotekspuljerne. Perlerne vaskes to gange med LNW1. Bibliotekerne elueres med frisk EE2 + HP3-elueringsblanding og neutraliseres med LNS1.

Klargøring

- Klargør følgende reagenser.
 - LNB1 – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - LNA1 – Bland på vortexblander.
 - EE2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - HP3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - LNW1 – Bland på vortexblander. Sæt til side til brug i proceduren.
 - LNS1 – Bland på vortexblander. Sæt til side til brug i proceduren.
- Bland LNB1 på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
Vend LNB1-røret op og ned for at sikre, at alle perlerne er resuspenderet.
- Brug en pipette indstillet til 800 µl til at pipettere LNB1 op og ned 10 gange for at sikre resuspension.
- Klargør straks frisk LNA1 + LNB1-masterblanding i et konisk rør.



FORSIGTIG

Resuspendér LNB1-perlepelleten helt i bunden af røret for at forhindre uensartet clusterdensitet.

Tabel 36 LNA1 + LNB1-masterblanding*

Bestandsdel i masterblandingen	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 31](#) for beregninger.

- Bland LNA1 + LNB1-masterblanding på vortexblander. Sæt til side for [Bind på side 69](#) trin.

6. Klargør frisk EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 37 EE2 + HP3-elueringsblanding til normalisering af biblioteker*

Bestandsdel i elueringsblandingen	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 31](#) for beregninger.

7. Bland frisk elueringsblanding på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt. Sæt til side for [Eluér på side 70](#) trin.
8. Hvis PL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og centrifugeres ved 280 × g i 1 minut. Bland ved pipettering.
9. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BBN (Perlebaseret normalisering).
10. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Bland LNA1+LNB1-masterblanding på vortexblander.
2. Tilføj straks 45 µl LNA1 + LNB1-masterblanding til hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen.
3. Kassér den resterende LNA1 + LNB1-masterblanding.
4. Tilføj 20 µl af hvert bibliotek fra PL PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BBN MIDI-pladen.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 30 minutter.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen, og sæt den tilbage i opbevaring.
8. Placér BBN MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
9. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

Vask

1. Vask perlerne, som følger.
 - a. Fjern BBN MIDI-pladen fra det magnetiske holder.
 - b. Tilføj 45 µl LNW1 til hver biblioteksbrønd.
 - c. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 - d. Omryst ved 1800 o/min. i 5 minutter.

- e. Placér BBN MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
- f. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende supernatant fra hver brønd.

Eluér

1. Fjern BBN MIDI-pladen fra det magnetiske holder.
2. Bland frisk EE2 + HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Tilføj 32 µl EE2 + HP3-opløsning til hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen.
4. Kassér den resterende elueringsblanding.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade NL (Normaliserede biblioteker).
9. Overfør forsigtigt 30 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i NL PCR-pladen.



FORSIGTIG

Hvis perlerne suges op i pipettespidsen, skal du dispensere perlerne tilbage på pladen på den magnetiske holder og vente, indtil væsken er klar (~2 minutter), inden du fortsætter til det næste trin i proceduren.

10. Kassér den tomme BBN MIDI-plade.
11. Bland LNS1 på vortexblander.
12. Tilføj 30 µl LNS1 til hver biblioteksbrønd i en ny NL PCR-plade.
13. Bland fem gange ved pipettering.
14. Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
15. Sæt LNB1, LNA1, EE2, LNW1 og LNS1 tilbage i opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal NL PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 32 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til sekventering.

Start klargøring af sekventeringsmaterialer fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklusser) (delnummer 20028871) mindst en time inden brug.

1. Tag biblioteksfortyndingsbufferen (HT1) ud af opbevaring ved -25 °C til -15 °C. Optøs ved stuetemperatur. Hold afkølet efter optøning.
2. Følg forberedelsesinstruktionerne i *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for andre forbrugsvarer i sættet.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklusser)
3. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys) æske (delnummer 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PhiX Internal Control (PX3 eller PhiX)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur. Hold afkølet efter optøning.	Klargør til sekventering

Tabel 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Klargør til sekventering
RSB (lyserødt mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Klargør til sekventering

Klargør til sekventering

Hver DNA- og RNA-sekventeringskørsel skal indeholde en positiv kontrol og en NTC. NTC'erne for DNA og RNA sekventeres gentagne gange, således at hver kørsel indeholder en NTC. Hver DNA- og RNA-kørsel inkluderer en separat, positiv kontrol.

Klargøring

1. Gennemgå retningslinjerne for [Antal biblioteker og valg af indekser på side 33](#).
2. Markér et mikrocentrifugerør dHP3 (fortyndet HP3).
3. Markér et mikrocentrifugerør dPhiX (fortyndet PhiX).
4. Forvarm en varmeblok til 96 °C til mikrocentrifugerør.

5. Klargør en isspand eller tilsvarende.

Fortynd og denaturér PhiX-kontrol

1. Bland HP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
2. Kombiner følgende volumener i dHP3-mikrocentrifugerørret.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Bland dHP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
4. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
5. Bland PhiX-kontrol på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Kombiner følgende volumener i dPhiX-mikrocentrifugerørret.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX-kontrol
7. Tilføj 10 µl dHP3 til dPhiX-rørret.
8. Kassér dHP3-rørret.
9. Bland dPhiX-rørret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
10. Inkubér dPhiX ved stuetemperatur i 5 minutter for at denaturere.
11. Bland HT1 på vortexblander.
12. Tilføj straks 980 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til dPhiX.
13. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
14. Placer PhiX køligt indtil klargøring af den anden fortynding.
Den endelige koncentration er 20 pM dPhiX.
15. Sæt PhiX, HP3 og RSB tilbage i opbevaring.

Samling og denaturering af biblioteker til TSO Comprehensive (EU)

1. Hvis NL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur, og derefter skal pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut.
2. Brug en multikanalpipette indstillet til 30 µl til forsigtigt at blande bibliotekerne i NL PCR-pladen 5 gange ved pipettering.
Brug friske spidser til hvert bibliotek.



FORSIGTIG

Sørg for at blande bibliotekerne godt for at opnå optimal ydeevne.

3. Vælg én af de følgende muligheder for at samle, denaturere og fortynde bibliotekerne.
 - **[Mulighed nr. 1]** Sekventer biblioteker afledt fra RNA-prøver og DNA-prøver på samme tid. Se [Mulighed 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen på side 73](#).

- [Mulighed nr. 2] Sekventer biblioteker afledt fra prøver, der udelukkende indeholder DNA. Se [Mulighed 2: Kun DNA-biblioteker på side 74](#).
- [Mulighed nr. 3] Sekventer biblioteker afledt fra prøver, der udelukkende indeholder RNA. Se [Mulighed 3: Kun RNA-biblioteker på side 75](#).

Mulighed 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen

1. Markér et mikrocentrifugerør PRL (Samlede RNA-biblioteker).
2. Markér et mikrocentrifugerør PDL (Samlede DNA-biblioteker).
3. Overfør 10 µl af hvert normaliseret RNA-bibliotek (cDNA) fra NL-pladen til PRL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
4. Overfør 10 µl af hvert normaliseret DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
5. Tilføj selvklæbende pladeforsegl til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Bland PRL- og PDL-rørene på vortexblander.
7. Centrifuger PRL- og PDL-rørene kortvarigt.
8. Inkubér PRL- og PDL-rørene i en varmeblok ved 96 °C i 2 minutter.
9. Hold PRL- og PDL-rørene afkølede i 5 minutter.
10. Bland PRL- og PDL-rørene på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
11. Hold PRL- og PDL-rørene afkølede.

Klargør første fortynding

1. Markér et mikrocentrifugerør DIL1 (Fortynding 1).
2. Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
3. Tilføj 5 µl PRL til DIL1-røret.
4. Kassér PDL- og PRL-rørene.
5. Tilføj 475 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
6. Bland DIL1-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).
5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

6. Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar derefter ved -25 °C til -15 °C i op til 32 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.

Mulighed 2: Kun DNA-biblioteker

1. Markér et mikrocentrifugerør PDL (Samlede DNA-biblioteker).
2. Overfør 10 µl af hvert normaliserede DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
3. Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
4. Bland PDL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
5. Inkubér PDL-røret i en varmekub ved 96 °C i 2 minutter.
6. Hold PDL-røret afkølet i 5 minutter.
7. Bland PDL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
8. Hold PDL-røret afkølet.

Klargør første fortynding

1. Markér et mikrocentrifugerør DIL1 (Fortynding 1).
2. Overfør 10 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
3. Kassér PDL-røret.
4. Tilføj 190 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
5. Bland DIL1 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).

5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar derefter ved -25 °C til -15 °C i op til 32 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.

Mulighed 3: Kun RNA-biblioteker

1. Markér et mikrocentrifugerør PRL (Samlede RNA-biblioteker).
2. Overfør 10 µl af hvert normaliserede RNA-bibliotek (cDNA) fra NL-pladen til PRL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
3. Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
4. Bland PRL-røret på vortexblander.
5. Centrifuger PRL-røret kortvarigt.
6. Inkubér PRL-røret i en varmeblok ved 96 °C i 2 minutter.
7. Hold PRL-røret afkølet i 5 minutter.
8. Bland PRL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
9. Hold PRL-røret afkølet.

Klargør første fortynding

1. Markér et mikrocentrifugerør DIL1 (Fortynding 1).
2. Overfør 10 µl PRL til det tomme DIL1-rør.
3. Kassér PRL-røret.
4. Tilføj 190 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
5. Bland DIL1 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.

3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1646 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:843).
5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Tilføj 16,7 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar ved -25 °C til -15 °C i op til 32 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx Instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.

Tolkning af resultater

Sekventeringsresultaterne fra TSO Comprehensive (EU)-analysen rapporteres individuelt i en PDF-rapport og en JSON-rapport. Derudover genereres en rapport om lav dybde (*LowDepthReport.tsv*) på prøveniveauet.

På kørselsniveauet genereres følgende outputfiler:

- *ControlOutput.tsv*
- *MetricsOutput.tsv*

Kun variationer, der består kvalitetskontrollen, vises i PDF- og JSON-rapporterne.

Se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661)* for detaljerede analyseoplysninger.

Resultater af ledsagende diagnosticering

Der er tre mulige resultater for hver tiltænkt anvendelse af ledsagende diagnosticering (CDx):

- **Positiv** – En variation eller biomarkør er detekteret og klassificeret som niveau 1 (CDx).
- **Ikke detekteret** – Der er ikke detekteret nogen variationer eller biomarkører tilknyttet den tiltænkte anvendelse af CDx i prøven. Den valgte tumortype for prøven er relevant for CDx.
- **Intet resultat** – Det er ikke muligt at fastslå en variationsstatus af én eller flere af de følgende årsager:
 - Den tiltænkte anvendelse af CDx var ikke relevant for den testede prøve, da den valgte tumortype for prøven ikke er relevant for tumortypen i CDx.
 - Sekventeringskørslen bestod ikke specifikationerne for kvalitetskontrollen.
 - Biblioteket bestod ikke de påkrævede specifikationer for kvalitetskontrollen.
 - Den relevante nukleinsyre blev ikke kørt.

Alle resultater for tiltænkt anvendelse af CDx rapporteres i afsnittet Companion Diagnostic Results (Resultater af ledsagende diagnosticering) i JSON-rapporten. Kun de tiltænkte anvendelser med et positivt resultat er anført i afsnittet Companion Diagnostic Results (Resultater af ledsagende diagnosticering) i PDF-rapporten.

Tumorprofileringsvariationer

TSO Comprehensive (EU) er designet til at rapportere somatiske variationer ved rapportering af variationer med evidens for klinisk signifikans eller variationer med potentiel klinisk signifikans. TSO Comprehensive (EU)-analysesoftwaren bruger en vidensbase, der afgør, om hver detekteret og kvalificeret variation ([Tabel 2](#)) er klinisk signifikant eller potentielt klinisk signifikant baseret på evidens for terapeutiske, diagnostiske eller prognostiske tilknytninger. Vidensbasen tager også højde for, om tilknytningerne er etablerede (eller ej) i den tumortype, der testes. Følsomheds- eller cancerrisikotilknytninger er ikke inkluderet i videnbasen. Almindelige polymorfier er fjernet.

Til tumorprofileringsvariationer klassificeres positive resultater i Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (Genomfund med evidens for klinisk signifikans) (niveau 2) eller Genomic Findings with Potential Clinical Significance (Genomfund med potentiel klinisk signifikans) (niveau 3) i henhold til den installerede vidensdatabase og den identificerede tumortype.

Fejl i kvalitetskontrol medfører ingen resultater for de typer af variationer, der er relevante for den mislykkede kvalitetskontrollmåling. Se [Tabel 40](#) og [Tabel 41](#) for yderligere oplysninger. Tumorprofileringsvariationer med utilstrækkelig dybde er anført i rapporten om lav dybde og ikke i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Kvalitetskontrol

- Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25](#) for at få mere at vide om kvantificering af nukleinsyre og minimumskrav til inputmateriale.
- Sekventeringskørsel og prøvevaliditet bestemmes automatisk og rapporteres af TSO Comprehensive (EU)-analysemodul. Se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661)* for detaljerede analyseoplysninger.
- TSO Comprehensive (EU)-rapporten, der er tilgængelig i PDF- og JSON-formater, opsummerer resultater af kvalitetskontroller. Rapportfilerne findes i analysemappen. Se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661)* for placeringen af analysemappen (indeholder PDF- og JSON-rapporter) og kørselsmappen.

Tabel 40 TSO Comprehensive (EU)-rapport, resultat af kvalitetskontrolmålinger

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
Sekventeringskørsel	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Procentdel af læsninger, der passerede filtret (PF).	Sekventeringskørsel ugyldiggjort. Ingen resultater rapporteret for nogen prøver i kørslen.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Gennemsnitlig procentdel af basebestemmelser med en kvalitetsscore på Q30 eller højere for læsning 1.	Sekventeringskørsel ugyldiggjort. Ingen resultater rapporteret for nogen prøver i kørslen.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Gennemsnitlig procentdel af basebestemmelser med en kvalitetsscore på Q30 eller højere for læsning 2.	
DNA-biblioteker	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ELLER > 3106 med P_VALUE ≤ 0,049	En måling, der vurderer sandsynligheden for kontaminering ved hjælp af variationsallelfrekvensen (VAF) for almindelige variationer. Kontamineringsscoren baseret på distribution af variationsallelfrekvens (VAF) for SNP'er. P-værdien for kontaminering anvendt til vurdering af højt omarrangerede genomer. Kun relevant, hvis kontamineringsscoren er over den øvre specifikationsgrænse.	Ingen DNA-resultater rapporteret.

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Den mediane fragmentlængde i prøven.	Ingen resultater rapporteret for TMB eller små DNA-varianter.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (antal)	≥ 150	Median exonfragmentdækning på tværs af alle exonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procentdel af exonbaser med 50X fragmentdækning.	
	USABLE_MSI_SITES (antal)	≥ 40	Antallet af MSI-steder, der er brugbare til MSI-bestemmelse (antallet af mikrosatellit-steder, der spænder over tilstrækkelige læsninger til at identificere mikrosatellit-instabilitet).	Ingen MSI-resultater rapporteret.
	COVERAGE_MAD (antal)	$\leq 0,210$	Medianen for absolutte afvigelser fra medianen af den normaliserede tælling for hvert CNV-målområde.	Ingen resultater rapporteret for genamplifikation.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (antal)	$\geq 1,0$	Median rå bin-antal pr. CNV-mål.	
RNA-biblioteker	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Den mediane fragmentlængde i prøven.	Ingen resultater rapporteret for fusioner eller splejsningsvariationer.

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koefficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X er en måling af ensartetheden af dækning. For hvert gen med mindst 500x dækning bliver variationskoefficienten for dækning på tværs af genet beregnet. Denne måling er medianen af disse værdier. En høj værdi angiver et højt variationsniveau og er tegn på et problem i forbindelse med biblioteksklargøringen, såsom lavt prøveinput og/eller problemer med pull-down af prober. Denne måling beregnes ved hjælp af alle læsninger (inklusive læsninger, der er markeret som duplikater).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (antal)	$\geq 9.000.000$	Det samlede antal læsninger, der bliver kortlagt mod målregionerne. Denne måling beregnes ved hjælp af alle læsninger (inklusive læsninger, der er markeret som duplikater).	

* Vellykkede resultater indikeres med PASS (BESTÅET).

Tabel 41 TSO Comprehensive (EU)-rapport, resultat af kontrolmålinger

Outputtype	Måling	Specifikation	Påvirkning fra specifikationsfejl*
Positiv kontrol	DNA ekstern kontrol	23 ud af 24 specificerede variationer detekteret	Ugyldiggør patientprøver manuelt baseret på resultater af kontrolprøver. Analysemodulets software ugyldiggør ikke automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver.
	RNA ekstern kontrol	12 ud af 13 specificerede variationer detekteret	
Ingen skabelonkontrol	DNA Median exondækning for TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Ugyldiggør patientprøver manuelt baseret på resultater af kontrolprøver. Analysemodulets software ugyldiggør ikke automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver.
	RNA-gen over median-skæringsværdi	≤ 1	

* Vellykkede resultater indikeres med PASS (BESTÅET).

- Gentag sekventeringskørsler, der er ugyldige.
- Gentag test af biblioteker med følgende resultater:
 - Kontamineret DNA-biblioteker
 - Ugyldige RNA-biblioteker
 - Test kan gentages for at opnå flere resultater for variationer eller biomarkører for DNA-biblioteker, der blev ugyldiggjort for én men ikke alle variationstyper.
- Positive kontroller evalueres for variationsbestemmelse. Hvis positive kontroller ikke opfylder kriterierne for variationsbestemmelse, skal sekventeringskørslen ugyldiggøres manuelt. Analysemodulets software ugyldiggør ikke automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver.
- NTC'er evalueres i forhold til median exondækningen for DNA og gener over median skæringsværdi for RNA. Hvis negative kontroller ikke opfylder specifikationerne, skal klargøring af bibliotek og alle tilknyttede sekventeringskørsler ugyldiggøres manuelt. Analysemodulets software ugyldiggør ikke automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver.
- Foretag yderligere kvalitetskontrolmålinger i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale forordninger eller akkrediteringskrav.

Se [Fejlfinding på side 82](#) for at få mere at vide om gentagelse af sekvenskørsler eller test af biblioteker.

Fejlfinding

Brug følgende tabel til fejlfinding af problemer i arbejdsgangen. Hvis en sekventeringskørsel eller klargøring af bibliotek mislykkes to gange, er yderligere fejlfinding nødvendig. Kontakt Illumina teknisk support.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Sekventeringskørslen lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol af kørslen.	- Puljefejl - Fortyndingsfejl - Ufuldstændig varmedenaturering af PRL/PDL - Problemer med klargøring af sekventeringsmaterialer (f.eks. ikke optøet tilstrækkeligt, kondensering/debris på gennemstrømningscelle)	Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 71.
	- Forkert brug af berigelsesprober (f.eks. OPR1-prober anvendt til DNA-prøver, OPD2-prober anvendt til RNA-prøver) - Fejl i arbejdsgang for biblioteksklargøring under eller efter første hybridiseringstrin.	Gentag berigelsestrin for biblioteker fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfigurer første hybridisering på side 55 .
	Krav til prøveinput blev ikke overholdt	Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Denaturering og annealing af RNA på side 41 eller Fragmentér gDNA på side 46 .
	Fejl i arbejdsgang for biblioteksklargøring under eller før indeks-PCR-trin	Gentag berigelsestrin for biblioteker fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfigurer første hybridisering på side 55 .
	Problem med instrumentet	Kontakt Illumina teknisk support.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Fejl under generering af rapport eller generel instrumentfejl (f.eks. netværksfejl, fejl under tilføjelse/fjernelse af reagenser osv.).	Software- eller instrumentfejl.	Se Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661) for hjælp til generering af rapporter. Kontakt Illumina teknisk support, hvis du har brug for yderligere hjælp.
DNA-biblioteket lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol.	Krav til prøveinput blev ikke overholdt.	Sørg for relevant prøveinput, og gentag klargøring af bibliotek fra trinnet Fragmentér gDNA. Se Krav til prøver på side 24 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25 .
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen.	Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illumina teknisk support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. - Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 71. - Gentag berigelsestrin for biblioteker fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfigurer første hybridisering på side 55. - Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Fragmentér gDNA på side 46.
	Kriterier for CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE er ikke opfyldt.	Gennemgå Advarsler og forholdsregler for oplysninger om, hvordan du undgår krydskontaminering. Gennemgå pladelayout og biblioteksindeksering for at sikre, at biblioteker med samme indeks ikke blev sekventeret sammen. For de biblioteker, der er påvirket, skal du starte klargøring af bibliotek fra arbejdsgangens begyndelse. Se Fragmentér gDNA på side 46 . Kontaminering kan være opstået under ekstraktion af prøven. Det kan være nødvendigt at gentage ekstraktion for at sikre, at prøven ikke er kontamineret.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
	Brugbart MSI mislykkedes.	Gennemgå producenten af ultrasonikatorens indstillinger for brug og drift (herunder vandniveau og rørtype). Sørg for det korrekte prøveinput i analysen. Se Krav til prøver på side 24 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25. Det kan være nødvendigt at ekstrahere en ny prøve eller gentage trinnet Fragmentér gDNA, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.
	Prøven er overfragmenteret, eller nukleinsyren er beskadiget, hvilket påvirker evnen til at generere tilstrækkelige unikke biblioteker.	Gennemgå Konfigurationsindstillinger for ultrasonikator til DNA-fragmentering på side 21 og ultralydsproducentens indstillinger for brug og drift (herunder vandniveau og rørtype). Sørg for det korrekte prøveinput i analysen. Se Krav til prøver på side 24 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25. Det kan være nødvendigt at ekstrahere en ny prøve eller gentage trinnet Fragmentér gDNA, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.
RNA-biblioteket levede ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol.	Krav til prøveinput blev ikke overholdt.	Sørg for korrekt prøveinput, og gentag klargøring af bibliotek fra trinnet Denaturering og annealing af RNA. Se Krav til prøver på side 24 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen.	Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illumina teknisk support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. • Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 71. • Gentag berigelsestrin for biblioteker fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfigurer første hybridisering på side 55. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Denaturering og annealing af RNA på side 41.
	Prøven kan være overfragmenteret, eller nukleinsyren kan være beskadiget, hvilket påvirker evnen til at generere tilstrækkelige unikke biblioteker.	Sørg for det korrekte prøveinput. Se Krav til prøver på side 24 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 25. Det kan være nødvendigt at ekstrahere prøven igen, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Fejl i positiv kontrol (DNA/RNA).	Krav til prøveinput for den positive kontrol blev ikke overholdt.	Sørg for korrekt input i analysen. Gennemgå pladelayout, og sørg for, at korrekte reagenser (prober, indekser) er i korrekte brønde. Sørg for, at den positive kontrol opbevares i henhold til mærkatet. For alle prøver, der deler den positive kontrol, gentages klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illumina teknisk support for hjælp til fejlfinding af din kørsel.
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen.	• Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 71. • Gentag berigelsestrin for biblioteker fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfigurer første hybridisering på side 55. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Denaturering og annealing af RNA på side 41 eller Fragmentér gDNA på side 46.
NTC-fejl (DNA/RNA).	Krydskontaminering opstod, eller arbejdsområdet er kontamineret.	Se afsnittet "Advarsler og forholdsregler" for oplysninger om dekontaminering af arbejdsområdet og forhindring af krydskontaminering. Gennemgå pladelayout og biblioteksindeksering for at sikre, at biblioteker med samme indeks ikke blev sekventeret sammen.
	Forkert indeksering af bibliotek.	Gentag klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen for alle biblioteker, der deler ingen skabelonkontrol.
Softwaren indikerer, at positive og/eller negative kontroller ikke var inkluderet i sekvenskørslen.	Forkert tildeling af cancertype i planlægning af Local Run Manager-kørslen.	Genaktiver analyse med kontroller, der er korrekt identificeret som angivet i "Vejledning til arbejdsgang for analysemodul" (se <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang</i> (dokumentnr. 200008661)).

Karakteristika for ydeevne

TSO Comprehensive (EU) er et målrettet NGS-panel, der detekterer ændringer i 517 gener. Små DNA-varianter – (enkeltnukleotidvariationer [SNV'er], multinukleotidvariationer [MNV'er], insertioner og deletioner) – er egnede til rapportering fra alle 517 gener. Tumormutationsbyrde rapporteres som en score baseret på en optælling af ikke-driver-somatiske varianter pr. megabase (se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661)* for nærmere oplysninger). MSI rapporteres som en status. Genamplifikationer er egnede til rapportering fra MET- og ERBB2-gener. Fusioner er egnede til rapportering fra de 23 gener, der er angivet i [Resumé og forklaring af analysen på side 1](#). Splejningsvariationer er egnede til rapportering fra MET- og EGFR-generne. For at kunne rapporteres skal variationer detekteres og have evidens i TSO Comprehensive (EU)-analysens videnbase og være egnede baseret på den vævstype, der testes. For at kunne rapporteres kræver NTRK-fusioner, at fusionspartneren er 5' og NTRK-kinasedomænet er intakt.

For små DNA-varianter blev der anvendt en repræsentativ tilgang til validering af målrettede gener i panelet med data, der repræsenterede SNV'er, MNV'er, insertioner og deletioner. For genamplifikationer, fusioner og splejningsvariationer blev testen udført på genniveau. TMB og MSI blev evalueret, hvor det er indikeret. For NTRK-fusioner CDx-krav blev fusioner i FFPE-prøver testet i studier fokuseret på ydeevne, der er specifik for kravet (såsom detektionsgrænse, intralaboratorumspræcision, reproducerbarhed, nøjagtighed og klinisk ydeevne).

[Tabel 42](#) angiver definitioner på målinger beregnet i forskellige studier.

Tabel 42 Definitioner på målinger

Betegnelse	Definition
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA)	Procentdelen af positive korrekt identificeret fra det samlede antal positive i forhold til en ortogonal metode.
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA)	Procentdelen af negative korrekt identificeret fra det samlede antal negative i forhold til en ortogonal metode.
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA)	Procentdelen af positive og negative korrekt identificeret fra det samlede antal observationer i forhold til en ortogonal metode.
Procentdel af positive bestemmelser (PPC)	Procentdelen af observationer, der er positive for et mål blandt observationer, der forventes at være positive for målet.

Betegnelse	Definition
Procentdel af negative bestemmelser (PNC)	Procentdelen af observationer, der er negative for et mål blandt observationer, der forventes at være negative for målet.
n/N	Antallet af positive eller negative observationer (n) divideret med de samlede observationer (N) for at beregne henholdsvis PPC eller PNC. Værdierne for n og N kan være på forskellige niveauer (f.eks. variant eller gen) eller kombineres på tværs af en gruppe (f.eks. SNV'er).
Standardafvigelse (SD)	Et mål for mængden af variation af værdierne af en variabel om dens middelværdi.
Procent variationskoefficient (%CV)	Standardafvigelse divideret med middelværdien som en procentdel.

Krydskontaminering

Krydskontamineringsstudiet blev udført for at evaluere, om falsk-positiv-resultater skyldtes brønd-til-brønd-kontaminering under klargøring af prøvebibliotek samt kørsel-til-kørsel-kontaminering mellem konsekutive sekventeringskørsler. Denne analyse blev udført for små DNA-varianter (som også påvirker TMB), fusioner, genamplifikationer og MSI. Biblioteker blev klargjort med karakteriserede prøver i et skakbrætdesign med skiftende prøver for at evaluere brønd-til-brønd-kontaminering og med skiftende indekser for at evaluere kontaminering mellem sekvenskørsler ved konsekutiv sekventering på det samme NextSeq 550Dx-instrument. Krydskontamineringsstudiet viste ingen kontamineringshændelser ved undersøgelse af de detekterede variationer i hver prøve, og der blev ikke observeret falske positiver.

To QC-målinger (CONTAMINATION_SCORE og P_VALUE) blev designet til TSO Comprehensive (EU)-analysen med henblik på påvisning af prøvekontaminering i DNA-prøver. Følsomheden for kontamineringsdetektion blev evalueret. FFPE-prøver med tumor-DNA blev blandet med varierende mængder af FFPE-prøver med normalt DNA for at skabe bevidst kontaminerede prøver.

I alt blev der genereret 1112 kontamineringsobservationer, og kontaminering blev påvist i 95 % (1054) af observationerne. Detektionsraten blev øget til 96 % (939/976), når procentdelen af kontaminering lå mellem 10 % og 90 % (masse/masse). Af de 37 observationer mellem 10 % og 90 % kontaminering, hvor kontaminering ikke blev påvist, opfyldte 12 ikke dækningsspecifikationen for observation af små DNA-varianter. Lav dækning hæmmer detektion af kontaminering, men små DNA-varianter rapporteres ikke, hvilket afhjælper eventuel kontaminerings effekt. 15 observationer opfyldte ikke genamplifikationsspecifikationen (median bin-tælling for kvalitetsmåling) til bestemmelse af genamplifikation. Der vil ikke blive rapporteret noget resultat for genamplifikation for prøverne.

Studiet viste, at TSO Comprehensive (EU)-analyse forventes at have en lav forekomst af krydskontaminering fra brønd til brønd eller kørsel til kørsel. Disse resultater sammen med kontamineringsmålingerne i softwaren afhjælper risikoen for falske variationsresultater på grund af prøvekontaminering.

Evaluering af sæt til nukleinsyreekstraktion

Tre kommercielt tilgængelige sæt til ekstraktion af DNA og RNA blev evalueret med TSO Comprehensive (EU). De tre ekstraktionssæt isolerede både RNA og DNA fra de samme sektioner af FFPE-væv. Sættene anvendte forskellige afparafrineringsmidler og trin til nukleinsyrebinding ([Tabel 43](#)). Sæt 1 er det sæt, der oftest bruges til at fastslå ydeevnen for TSO Comprehensive (EU).

Tabel 43 Sættets karakteristika

Sæt	Afparafrinerings middel	Nukleinsyre binding
1	Ejendomsretligt beskyttet	Kolonne
2	Xylen	Kolonne
3	Mineralsk olie	Magnetiske perler

[Tabel 44](#) og [Tabel 45](#) opsummerer de indvirkninger ekstraktionssæt har på validiteten af et bibliotek og variationsbestemmelse. Forskellen blev rapporteret, hvis ekstraktionssættets middelværdier afveg signifikant. Middelværdiforskelle mellem ekstraktionssæt blev beregnet med sæt 1 som kontrol, da sæt 1 blev brugt til at ekstrahere de fleste af de nukleinsyrer, der blev brugt til TSO Comprehensive (EU) analytiske undersøgelser. Den gennemsnitlige forskel i forhold til sæt 1 blev rapporteret for at illustrere, hvordan forskellige ekstraktionssæt ville påvirke de andre TSO Comprehensive (EU) analytiske studier.

Tabel 44 Ekstraktionssættets indvirkning på validiteten af bibliotek

Variationstype	Kvalitetskontrolmåling af RNA-biblioteker	Middelværdiforskel i forhold til sæt 1
DNA små variationer/TMB	Medianværdi for exondækning (antal) PCT Exon 50X (%) Medianværdi for indsatsstørrelse (bp)	Sæt 2 lavere med 56 aflæsninger Sæt 3 højere med 0,298 % Sæt 2 og sæt 3 lavere med 3 bp
DNA MSI	Brugbare MSI-steder	Sæt 3 højere med 8 centre
DNA-genamplifikationer	Coverage MAD (antal) Medianværdi for bin-antal	Sæt 2 lavere med 0,0043 Sæt 2 lavere med 0,5825, sæt 3 højere med 0,3086
RNA (fusioner/splejningsvariationer)	Medianværdi for indsatsstørrelse (bp) Log (medianværdi for CV Gene500X) Samlet antal mållæsninger	Sæt 3 højere med 2 bp Sæt 2 højere med 0,029 Ingen signifikant forskel

Ekstraktionssæt 2 og sæt 3 blev observeret til at have øgede understøttende læsninger, således at fusioner og splejningsvariationer nær LoD har en større sandsynlighed for detektion på grund af valg af ekstraktionssæt.

Tabel 45 Ekstraktionssættets indvirkning på validiteten af variationsbestemmelse

Varianttype (enheder)	Variantbestemmelse (middelværdi for forskel i forhold til kit 1)
Små DNA-varianter (VAF)	Ikke teknisk signifikant Målrettede varianter: variation mellem sæt var lille i forhold til resterende Ikke-målrettede varianter: Ingen signifikante forskelle for de første to VAF-områder (bins). Ingen meningsfulde forskelle, når statistisk signifikans observeres.
TMB (mutation per megabase)	Ikke teknisk signifikant, variationen mellem sæt var lille i forhold til resterende
MSI (% ustabile steder)	Sæt 3 lavere med 1,9 % ustabile steder
Genamplifikation (foldændring)	Sæt 2 (0,06) og sæt 3 (0,08) havde højere foldændring
Fusioner (understøttende læsninger)	Sæt 2 havde 51 %, og sæt 3 havde 23 % stigning i understøttende læsninger
Splejsningsvariationer (understøttende læsninger)	Sæt 2 og sæt 3 havde en stigning på 48 % i understøttende læsninger

Interfererende stoffer

Effekten af potentielle endogene og eksogene stoffer på TSO Comprehensive (EU)-analysens ydeevne blev evalueret. Prøverne blev opspædet med endogene stoffer, melanin og hæmoglobin under processen med ekstraktion af nukleinsyre. Eksogene stoffer (ethanol, xylene og Proteinase K) var til stede under processen med ekstraktion af nukleinsyre, men blev også opspædet til den oprensede nukleinsyre inden klargøring af bibliotek. Hvis der blev observeret interferens med beriget proteinase K, blev øgede koncentrationer af proteinase K også evalueret under ekstraktionsprocessen. Overskydende indeksprimere (15 % og 30 %) blev tilføjet under biblioteksklargøring. Undtænkelige indeksprimere, stoffer blev tilføjet til FFPE-prøver fra hjerne, bryst, colon, lunge, medullær thyroidea, NSCLC, ovarie, prostata, spyt, hud, bløddeler og thyroideavæv – otte prøver blev ekstraheret til DNA-analyse, og 13 blev ekstraheret til RNA-analyse. For indeksprimere blev seks FFPE-prøver fra tre forskellige vævstyper (skjoldbruskkirtel, blære, tyktarm) brugt til DNA-analyse, og fem FFPE-prøver fra fire forskellige vævstyper (lunge, skjoldbruskkirtel, tyktarm, bryst) blev brugt til RNA-analyse. Der var en endogen kontrol uden spids- og buffer- eller vandberiget eksogen kontrol for hver af de 16 unikke prøver. Effekten af nekrose blev vurderet på et andet sæt af otte FFPE-prøver af væv fra lunger, hjerne og tyktarm. Der var en makrodissekeret kontrol uden nekrose for hver nekroseprøve. For alle forstyrrelser blev fire replikater per prøve per stof testet ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med deres respektive kontroller for detektering af små DNA-varianter, genamplifikationer, RNA-amplifikationer, RNA-fusioner og RNA-splejsningsvariationer samt for MSI-status og TMB-score. Både CDx- og tumorprofileringsvarianter blev inkluderet.

Detektering af DNA-variation

Melanin (0,2 µg/ml), hæmoglobin (2 mg/ml), ethanol (5 %), proteinase K (0,04 mg/ml i nukleinsyre) og xylen (0,0001 %) interfererer ikke med TMB-score, MSI-status, små DNA-variationer og genamplifikationer.

Detektering af RNA-variation

Dataene understøtter, at melanin (0,2 µg/ml), ethanol (5 %) og xylen (0,0001 %) ikke interfererer med RNA-fusioner eller splejsningsvariationer. Hæmoglobin (2 mg/ml) interfererede (reducerede understøttende læsninger) med tre forskellige splejsningsvariationer i MET-genet. En splejsningsvariant i AR-genet (tre forskellige prøver) og en i EGFR-genet (en prøve) blev ikke påvirket. Hvis laboratoriet kører RNA sammen med analysen, skal væv med hæmoglobin undgås eller minimeres, når der tages snit fra vævsblokken.

Proteinase K (0,04 mg/ml i nukleinsyre) interfererede med RNA-fusioner og splejsningsvariationer. Proteinase K blev testet ved 2,6 mg/ml og 5,2 mg/ml under ekstraktionsprocessen, som er 2x og 4x standardkoncentrationen i et kommercielt tilgængeligt kit. Fusioner blev hæmmet ved 4x, men ikke 2x Proteinase K. Splejsningsvarianter blev hæmmet ved 2x Proteinase K. Proteinase K eller tilsvarende enzym bør ikke øges under ekstraktion fra standardkoncentrationen i et ekstraktionskit.

Splejsningsvariation, der understøtter læsninger, falder med 30 % overskydende indeksprimere, men ikke med 15 % overskydende.

Nekrose

Tilstedeværelsen af nekrotisk væv op til 70 % interfererede ikke med detektering af TMB-score, MSI-status, små DNA-variationer. RNA-varianter (understøttende aflæsninger) og genamplifikation (foldændring) detektion blev reduceret i prøver med ≥ 25 % og ≥ 23 % (efter område) nekrotisk indhold i vævsområdet. Hvis prøvesektionen indeholder mere end 23 % nekrose i det samlede vævsområde, skal det nekrotiske væv makrodissekteres.

Stabilitet

Realtidsstabilitet

Realtidsstabilitet blev anvendt til at fastslå holdbarhedsperioden for TSO Comprehensive (EU) analysesættet ved opbevaring i henhold til betingelserne på mærkaten. Studiets design var baseret på test af tre reagenspartier og brugte det klassiske stabilitetsdesign, der er beskrevet i CLSI EP25-A. Sættene blev opbevaret i den endelige sætkonfiguration under hele studiet ved opbevaringsforhold, der er defineret på produktmærket. Frosne sætkomponenter blev opbevaret ved -15 °C til -25 °C. Nedkølede sætkomponenter blev opbevaret ved 2 °C til 8 °C.

Sættet blev testet for udseende og kriterier for funktionel frigivelse på angivne tidspunkter. Derudover blev variationsbestemmelse og tendenser for kvalitetskontrolmålinger af prøven analyseret for kontrolmateriale til kvalitetskontrol. Holdbarhedsperioden blev bestemt for hver reagens. Udløbsdatoer tildeles baseret på produktionsdato og holdbarhedsperiode. Sættets udløbsdato tildeles baseret på den reagens, der udløber først.

Sættets stabilitet under brug

TSO Comprehensive (EU)-analysesættets stabilitet under brug blev evalueret under forhold med standardbrug gennem holdbarhedsperioden for at understøtte anvendelse af flere sæt. Reagenssættet blev frosset ned/tøet op gentagne gange og testet for at understøtte op til 4 brug af sættet. Derudover blev 8 RNA- og 8 DNA-biblioteker klargjort i alt 3 gange for at teste det maksimale antal understøttede biblioteker (24 DNA- og 24 RNA-biblioteker per sæt). Alle kriterier for funktionel frigivelse for sættet blev opfyldt for alle nedfrysings-/optøningscyklusser og testede tidspunkter. Test af FFPE-prøver med reagenser ≥ 25 måneder blev udført for at vurdere indvirkningen af test under brug på variationsbestemmelse. En kvalitativ analyse af målrettede variationer påviser, at hændelser under brug ikke påvirkede variationsbestemmelse.

Nukleinsyrestabilitet

Stabiliteten af nukleinsyrer (DNA og RNA) og deres tilknyttede kvantificering til brug med TSO Comprehensive (EU)-analysen blev evalueret ved hjælp af FFPE-prøver fra flere vævstyper. FFPE-blokke blev opdelt, og alle nukleinsyrer blev ekstraheret på én gang. Ekstraheret nukleinsyre blev grundigt blandet, kvantificeret og kontrolleret for nukleinsyre kvalitet og alikvoteret i to sæt engangsrør, der skal nedfryses på to tidspunkter: T0 kontrol (baseline) og T1 test (≥ 28 dage). Alt ekstraheret RNA blev opbevaret ved -85°C til -65°C , og alt ekstraheret DNA blev opbevaret ved -25°C til -15°C i den angivne periode og derefter behandlet med TSO Comprehensive (EU)-analysen på tværs af flere replikater og operatører. T1-testtilstanden blev sammenlignet med kontrollen for MSI-status, TMB-score, genamplifikationer, små DNA-varianter, RNA-fusioner og RNA-splejningsvarianter. Dataene indikerer, at nukleinsyrer og deres tilhørende kvantificering til brug sammen med TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i op til 28 dage, når de opbevares ved de anbefalede temperaturer (RNA ved -85°C til -65°C og DNA ved -25°C til -15°C).

Biblioteksstabilitet

Stabiliteten af biblioteker, der anvender hvert af de seks sikre stoptidspunkter for analysen (se [Tabel 5](#)), blev evalueret ved hjælp af FFPE-prøver fra flere vævstyper. Kontrolbiblioteker (T0, ingen stoptidspunkter) blev sekvenseret med det samme ved slutningen af arbejdsgangen. Alikvoter fra de samme biblioteker blev afholdt ved stoptidspunkterne ved -25°C til -15°C i den tid (T1) til at understøtte de dage, der er angivet i [Tabel 5](#). T1 blev sammenlignet med T0 for små DNA-varianter, TMB, genamplifikationer, MSI, RNA-fusioner og RNA-splejningsvarianter med CDx- og tumorprofileringsvarianter. Dataene angiver, at biblioteker genereret fra TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i overensstemmelse med brugsanvisningen.

Stabiliteten af FFPE-væv på objektglas

Stabiliteten af FFPE-væv på objektglas til brug sammen med TSO Comprehensive (EU)-analysen blev evalueret ved at opdele FFPE-blokke (5 μm sektioner) fra forskellige unikke prøver, overført til objektglas, og efterfølgende opbevare dem ved stuetemperatur (22°C) på 2 tidspunkter. RNA blev ekstraheret og opbevaret ved -65°C til -85°C , og DNA blev ekstraheret og opbevaret ved -15°C til -25°C i mindre end 1 uge før testning. Nukleinsyremateriale blev kvantificeret og derefter behandlet med TSO Comprehensive (EU)-analysen inden for 24 timer efter hvert tidspunkt. På hvert tidspunkt blev flere replikater og operatører per prøve testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med T0-tidspunktet for MSI, TMB,

genamplifikationer, små DNA-varianter, RNA-fusioner og RNA-splejningsvarianter, herunder CDx- og tumorprofileringsvarianter. Variantbestemmelse blev vurderet og opfyldte alle acceptkriterier, hvilket indikerer, at FFPE-væv monteret på objektglas til brug sammen med TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabilt ved stuetemperatur i op til 4 uger (28 dage). Det bemærkes, at der blev registreret et fald på 10 % i MSI-bibliotekets QC-validitetsrate efter 4 uger (28 dage) på grund af en kombination af operatør og opbevaringstid. RNA-fusioner og splejningsvarianter havde et fald på ca. 29 % i understøttende læsninger efter opbevaring på objektglas i 4 uger (28 dage).

Sikkerheden for titreringsinput af nukleinsyre

Nukleinsyreinput for TSO Comprehensive (EU)-analysen blev evalueret ved at teste DNA fra 33 FFPE-prøver, der omfattede 17 vævstyper, på inputniveauer fra 10 ng til 500 ng, og ved at teste RNA fra 5 FFPE-prøver fra 5 vævstyper på inputniveauer fra 10 ng til 85 ng. Kvalitetsmålinger af biblioteket blev evalueret og blev fundet til at være afhængige af prøven. DNA-resultaterne viste, at kvalitetsmålinger for nogle, men ikke alle, DNA-prøver, reagerer på øget input over det nominelle 40 ng input:

- MEDIAN_INSERT_SIZE reagerede ikke på input over 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE udviste en positiv korrelation med øget input.
- PCT_EXON_50X steg med et øget input op til 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES steg med et øget input. Visse prøver med færre end 40 USABLE_MSI_SITES ved 40 ng opfyldte specifikationen ved højere input, hvilket muliggør beregning af en MSI-score.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET steg med øget input.
- Øget input for at øge COVERAGE_MAD mod den øvre specifikationsgrænse.

Kvalitetsmålinger af RNA-prøver øgede (MEDIAN_INSERT_SIZE og TOTAL_ON_TARGET_READS) eller reducerede (MEDIAN_CV_GENE_500X) fra 10 ng til 40 ng, men ændrede sig generelt ikke ved et input mellem 40 ng og 85 ng.

Blindgrænse

Procentdel af falsk positive (ud af de samlede, forventede negative) blev evalueret ved hjælp af FFPE normalt eller godartet, tilstødende væv, der ikke må indeholde somatiske variationer af små DNA-varianter, genamplifikationer, MSI, RNA-fusioner og RNA-splejningsvarianter. Falsk positive blev ikke analyseret for TMB, da der ikke er nogen klinisk grænseværdi. Seks DNA- og 6 RNA FFPE-prøver blev kørt dobbelt med 2 operatører over 3 dage for hver af de 2 reagenspartier. Et undersæt af prøver blev samlet i en ny pulje og sekventeret igen i et 3x udelukkende DNA- og et 3x udelukkende RNA-format for at evaluere falsk positive med flere multipleks-konfigurationer understøttet af denne enhed. Derudover blev 30 yderligere RNA-prøver kørt dobbelt, behandlet med 1 reagensparti og opdelt mellem 2 operatører. I alt var der 168 mulige observationer for DNA og 228 observationer for RNA reduceret med ugyldige biblioteker for hver variationstype. Procentdelen af falsk positive blev beregnet på genniveau for amplifikationer og på positionsniveau (ca. 1,9 millioner positioner) for små DNA-varianter. Procentdelen af falske positive for DNA-varianter er vist i [Tabel 46](#). TSO Comprehensive (EU) har ingen CDx-påstande (niveau 1) for små DNA-varianter, så ingen små

DNA-varianter kan rapporteres falske positive for niveau 1. De 271 falske positive blev udjævnet af TSO Comprehensive (EU) vidensbasen. Ingen falske positive var klinisk signifikante (niveau 2). Der var 4 falske positive i niveau 3 som følge af 2 varianter på tværs af 4 (2,4 %) observationer ud af de 168 observationer. Procentdelen af falsk positive for RNA-fusioner og splejsningsvarianter var 0 % som vist i [Tabel 47](#).

Tabel 46 Falsk positive efter DNA-variationstype

Variationstype	Falsk positive
Genamplifikationer	0 % (0/9912)
Små DNA-varianter	0,0001 % (271/295.801.567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	I/T*

* Falsk positive er ikke relevante, da TMB rapporteres som en score og ikke har et kvalitativt resultat.

Tabel 47 Falsk positive efter RNA-variationstype

Variationstype	Falsk positive
Fusion	0 % (0/227)
Splejsningsvariation	0 % (0/227)

Detektionsgrænse

Der blev foretaget to studier for at evaluere detektionsgrænsen for TSO Comprehensive (EU). Studie 1 evaluerede RET små DNA-varianter, RET-fusioner og NTRK1-3-fusioner. Studie 2 evaluerede andre varianter af tumorprofilering.

Studie 1

Detektionsgrænse (LoD'er) for NTRK1-, NTRK3- og RET små DNA-varianter og NTRK1-3- og RET-fusioner blev bestemt. LoD er den laveste analytværdi (f.eks. variationsallelfrekvens eller understøttende læsninger), der kan detekteres konsekvent (95 % detekteringsgrænse eller en type II-fejl på 5 %). FFPE-væv med små RET DNA-varianter (medullær thyreoideacancer), RET-fusioner (papillær thyreoideacancer, atypisk Spitz-tumor) og NTRK1-3-fusioner (lavgradsgliom, glioblastom, myofibroblastisk sarkom, sarkom, sekretorisk brystcancer, coloncancer) samt en FFPE-behandlet cellerlinje med NTRK1 og NTRK3 små DNA-varianter blev anvendt i dette studie. Hver prøve blev fortyndet til mindst 5 testniveauer (varierende fra ca. 0,01-0,10 VAF for små DNA-varianter og ca. 2-25 understøttende læsninger for fusioner). Der var 18 observationer for hvert testniveau per parti per variation genereret af 3 operatører og 3 sekventeringsinstrumenter med initiering af biblioteksklargøring på 3 ikke på hinanden følgende dage med 2 replikater af hvert prøvetestniveau. To reagenspartier blev testet.

For DNA-varianter blev de 2 partier analyseret uafhængigt ved hjælp af probit-regression eller hitrate-metoden (laveste testniveau med en hitrate (punktestimat) $\geq 95\%$) for at bestemme LoD for hver variation efter parti. Den største LoD på tværs af de to reagenspartier blev taget som detekteringsgrænsen for variationen (Tabel 48).

For RNA-fusioner blev FFPE-cellelinjer anvendt til at estimere LoD-værdierne for hvert fusionsgen. LoD'erne blev herefter verificeret med FFPE-væv ved hjælp af dobbelte klargøringer af biblioteker på tværs af 3 operatører, 3 instrumenter og 3 partier for at generere 54 observationer per variation i nærheden af den LoD, der blev etableret med FFPE-cellelinjer. De krævede detektionsgrænser for hver fusion (Tabel 49) er de lavest gennemsnitlige understøttende læsninger, der nåede en hitrate (punktestimat) $\geq 95\%$.

Tabel 48 Detektionsgrænse for NTRK1, NTRK3 og RET små DNA-varianter

Markør	Chr ¹	Position	Reference	Alternativ	Detektionsgrænse (Variationsallel frekvens)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (deletion) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = kromosom

² Disse DNA-varianter blev analyseret ved probit-regression, de andre DNA-varianter blev analyseret med hitrate-metoden.

Tabel 49 Detektionsgrænse for NTRK- og RET-fusioner

Gen	Fusion	Detektionsgrænse (Understøttende læsninger)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3

Gen	Fusion	Detektionsgrænse (Understøttende læsninger)
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Studie 2

Detektionsgrænserne (LoD'er) for variationer i tumorprofilering rapporteret af TSO Comprehensive (EU) blev evalueret. LoD er den laveste analytværdi (variationsallelfrekvens, foldændring eller understøttende læsninger), der kan detekteres konsekvent (95 % hitrate eller en type II-fejl på 5 %). FFPE-prøver fra 17 vævstyper indeholdende variationer blev fortyndet til flere testniveauer. Der blev genereret seks observationer pr. niveau af to operatører, der begge brugte et andet reagensparti og et andet instrument.

DNA-varianter

LoD'er for 10 små DNA-variationsklasser (25 variationer i alt) og 2 DNA-genamplifikationer (ERBB2 og MET) blev bestemt og opsummeret som intervaller ([Tabel 50](#)). RET-varianter for LoD fra studie 1 er også inkluderet. To ud af de tre indsætninger med mere end 5 bp havde LoD'er på 0,034 og 0,036 VAF, og den tredje havde en LoD på 0,215 VAF. Sidstnævnte havde en indsætning i en region med lav kompleksitet, hvor indsætningen tilføjer yderligere gentagelser, påvirker alignment og kræver flere læsninger for konsekvent detektering. Visse genomiske kontekster med lav kompleksitet kan derfor påvirke detektering af indsætninger > 5 bp.

Tabel 50 Detektionsgrænse for små DNA-varianter og genamplifikationer

Type (måleenhed for LoD)	Variationsklasse/ genomisk kontekst	Antal variationer	Område (VAF)
Små DNA-varianter (variationsallel frekvens)	SNV'er	5	0,016-0,064
	MNV'er	3	0,022-0,048
	Indsætning (1-2 bp) nær homopolymergentagelser	2	0,086-0,104
	Indsætning (1-2 bp) nær dinukleotidgentagelser	2	0,038-0,051
	Indsætning (3-5 bp)	2	0,030-0,056
	Indsætning (> 5 bp og op til 25 bp)	3	0,034-0,215
	Deletion (1-2 bp) nær homopolymergentagelser	2	0,094-0,100
	Deletion (1-2 bp) nær dinukleotidgentagelser	2	0,033-0,070
	Deletion (3-5 bp)	2	0,028-0,064
	Deletion (> 5 og op til 25 bp)	2	0,047-0,055
Genamplifikationer (foldændring)	Efter gen (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analyse af ikke-målrettede varianter blev udført fra studie 1-prøver, der havde mindst fem testniveauer. Hver ikke-målrettet variant blev analyseret individuelt, og en LoD blev kun estimeret for variationer med mindst ét niveau > 0 % og ≤ 95 % hitrate og mindst ét niveau ≥ 95 % hitrate. [Tabel 51](#) viser percentiler sammen med de minimale og maksimale LoD'er observeret efter klasse for de ikke-målrettede varianter. De ikke-målrettede varianter giver flere varianter efter klasse, end der blev testet i studie 2, og er i overensstemmelse med LoD-områderne fra [Tabel 50](#).

Tabel 51 Oversigtsstatistik for detektionsgrænser efter klasse af ikke-målrettede varianter (fra studie 1)

Klasse	N	Min.	25 %	50 %	75 %	90 %	Maks.
SNV	862	0,020	0,047	0,059	0,079	0,097	0,592
MNV	5	0,038	0,040	0,050	0,086	0,095	0,095
Insertion	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Deletion	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fusioner

LoD'er blev bestemt for 19 fusioner, der udgjorde 20 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet, varierende fra 9 til 31,3 understøttende læsninger (Tabel 52). Yderligere 3 gener (NTRK1-3) blev testet i det andet studie. Der blev testet for RET-genet både her og i det andet studie. 16 fusioner med fastslåede LoD'er havde data, der var i overensstemmelse med en generel LoD for 16 understøttende læsninger ved hjælp af en dobbeltsidet, 95 % øvre pålidelighedsgrænse (UCL). To fusioner havde LoD'er på 24,7 og 31,3 understøttede læsninger, der ikke var i overensstemmelse med den generelle LoD.

Fusionen FGFR2-SRPK2 med en LoD på 24,7 understøttede læsninger havde overlappende repeat-regioner ved brudpunktet som kommenteret af TSO Comprehensive (EU)-analysesoftware. Repeat-regioner i et brudpunkt har typisk lavere niveauer af evidens, idet læsninger kan være tilknyttet andetsteds i genomet eller forbliver ikke-alignet. Derudover gør repeat-regioner processen med sidestilling (der bruges til at identificere fusionssekvenser) mere udfordrende og kræver yderligere evidens for at konstruere den korrekte sekvens. SEPT14-EGFR er et andet eksempel på en fusion med homolog sekvens i brudpunktet.

Fusionen BCL2-IGHJ5 med en LoD på 31,3 understøttende læsninger havde et meget kort gen (IGHJ5) med brudpunktet nær starten af en exon, der kræver alignment med introduktion af korte huller. Flere læsninger var således påkrævet for konsekvent detektering.

Tabel 52 Detektionsgrænse for fusioner

Fusion	Gen A , brudpunkt	Gen B, brudpunkt	LoD	Generel LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	ja
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	ja
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	ja
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	ja
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	ja
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ja
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	ja
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ja
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	ja

Fusion	Gen A , brudpunkt	Gen B, brudpunkt	LoD	Generel LoD
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	ja
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nej
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	ja
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	ja
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	ja
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	ja
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	ja
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	ja
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	nej
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	ja

Splejsningsvariationer

De to RNA-splejsningsvariationer, MET og EGFR, havde LoD'er på henholdsvis 18,7 og 16,7 understøttende læsninger.

Tumorindhold

Resultaterne i studiet giver anbefaling til tumorindhold for kliniske prøver. Generelt, jo højere tumorindholdet er, jo højere er "signalet" (VAF, foldændring eller understøttende læsninger) for variationer i tumoren. Anbefalinger for minimum tumorindhold er baseret på følgende observationer. LoD-værdier for små DNA-variationer er ikke højere end 0,104 VAF (med undtagelse af TP53-indsætningen). For at detektere aktiverende mutationer i tumoren (0,50 variationsallelfrekvens) anbefales 20 % tumorindhold, således at disse mutationer har 0,10 VAF og er ved eller over LoD. Ved et tumorindhold på 20 % ville gener amplificeret til en 5,5 foldændring (11 kopier) blive detekteret konsekvent baseret på en detektionsgrænse på 1,8 foldændring. Ved et tumorindhold på 20 % ville fusioner med 74 understøttede læsninger blive detekteret konsekvent baseret på en detektionsgrænse på 14,7 understøttende læsninger.

Reproducerbarhed

Der blev udført to studier for at evaluere reproducerbarheden for TSO Comprehensive (EU)-analysen. Studie 1 evaluerede RET små DNA-variationer samt NTRK- og RET-fusionsvariationer. Studie 2 evaluerede yderligere variationer af tumorprofilering.

Studie 1

Der blev foretaget et studie for at vurdere reproducerbarheden af TSO Comprehensive (EU)-analysen på tværs af 3 testlaboratorier (1 internt, 2 eksterne) med 2 operatører per laboratorium, 2 replikater i samme kørsel og 3 ikke på hinanden følgende testdage. Testen blev udført med et reproduktionspanel, inklusive DNA-prøver indeholdende specifikke, kendte RET små DNA-varianter og RNA-prøver, der indeholder specifikke, kendte NTRK1-3- og RET-fusionsvarianter fra formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) vævsprøver og cellerlinjer. Panelet indeholdt DNA- og RNA-panelementer med lave variationsniveauer og høje variationsniveauer med det samme antal panelementer på lavt og højt niveau for hver variationsklasse. Panelementer med højt niveau blev målrettet ca. 2 til 3 gange højere end LoD, og panelementer med lavt niveau blev målrettet omtrent ved LoD. På hvert laboratorium testede operatøren panelementerne dobbelt 3 gange, hvilket genererede 6 observationer per mål per panelement. Fra alle 3 laboratorier blev der genereret 36 observationer per panelement (3 laboratorier/instrumenter × 2 operatører × 2 replikater i samme kørsel × 3 startdage).

PPC'er og PNC'er for målrettede DNA-varianter og målrettede RNA-fusionsvarianter på højt niveau blev bestemt som primære endepunkter. PPC'er og PNC'er for målrettede små DNA-varianter og målrettede RNA-fusionsvarianter på lavt niveau blev beregnet som sekundære endepunkter. Tosidede 95 % konfidensintervaller (CI'er) tilknyttet alle endepunkter blev beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden. Primære analyser blev udført for at estimere PPC og PNC (med tilknyttede 95 % konfidensintervaller) i de målrettede panelementer på højt niveau ved at kombinere observationer fra TSO Comprehensive (EU)-analysen for et givet mål i en gruppe af panelementer, der repræsenterer den relevante variationsklasse (f.eks. små DNA-varianter og RNA-fusioner) på tværs af laboratorier/instrumenter, operatører og kørsler. For hver målrettet variation blev observationer fra TSO Comprehensive (EU)-analysen i andre panelementer på højt niveau, der var målrettet til den samme variationstype, men som ikke indeholdt den samme variation som fastlagt efter flertalsreglen, kombineret til beregnet PNC. Den samlede PPC og PNC for de målrettede panelementer på lavt niveau blev bestemt på lignende måde.

RET Små DNA-varianter

For de små DNA-varianter panelementer på højt niveau var den samlede PPC 100,0 % (207/207; 95 % CI: 98,2 % til 100,0 %) ([Tabel 53](#)). Den samlede PNC for de små DNA-varianter panelementer på højt niveau var 100,0 % (1035/1035; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %) ([Tabel 54](#)). For de målrettede små DNA-varianter panelementer på lavt niveau var den samlede PPC for de målrettede små DNA-varianter panelementer på lavt niveau 99,1 % (210/212; 95 % CI: 96,6 % til 99,7 %), og den samlede PNC var 100,0 % (1026/1026; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %).

Tabel 53 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af RET små DNA-varianter i målrettede panelelementer på højt og lavt niveau

Variationsniveau	Varianttype	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (aminosyre)	N	Gennemsnitlig VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95 % CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alle små DNA-varianter høje	Alle små DNA-varianter høje	Alle små DNA-varianter høje	207	N/A ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alle små DNA-varianter lav	Alle små DNA-varianter lav	Alle små DNA-varianter lav	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Forkortelser: I/R, gælder ikke; VAF, variationsallelfrekvens.² 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson-scoremetoden.

Tabel 54 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af RET små DNA-varianter i målrettede panelelementer på højt og lavt niveau

Variationsniveau	Varianttype	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (amino-syre)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Alle små DNA-varianter høje	Alle små DNA-varianter høje	Alle små DNA-varianter høje	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Alle små DNA-varianter lav	Alle små DNA-varianter lav	Alle små DNA-varianter lav	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Alle observationer samlet fra variationskombinationer af panelelementer, for hvilke størstedelen af bestemmelserne er negative (målrettede variationer indeholdende variationer med mindre end 50 % positive bestemmelser).

² 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson-scoremetoden.

Tabel 55 viser varianskomponentanalysen af variationsallelfrekvenser (VAF'er) på tværs af ca. 36 observationer for hvert panelement. Standardafvigelsen (SD) og procentkoefficienten af variation (% CV; samlet og for hver kilde) blev beregnet og præsenteret for hver målrettet RET lille DNA-variation.

Tabel 55 TSO Comprehensive (EU)-analyse - Varianskomponentanalyse af VAF i panelementer for målrettede små DNA-variationer

Variationsniveau	Varianttype	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (Aminosyre)	N	Gennemsnitlig VAF	SD for sted (% CV)	SD for operator (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for replikat (% CV)	SD i alt (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (5,5)	0,017 (8,6)	0,020 (10,2)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	0,002 (2,5)	0,006 (9,9)	0,004 (6,4)	0,010 (16,2)	0,013 (20,2)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)

NTRK 1-3 og RET-fusioner

For panelelementer med højt niveau i RNA-fusioner var den samlede PPC 99,3 % (285/287; 95 % CI: 97,5 % til 99,8 %) (Tabel 56). PPC var 100 % for hvert panelelement med højt niveau, med undtagelse af panelelementet BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % CI: 81,9 % til 98,5 %]). Den samlede PNC for panelelementer med højt niveau i RNA-fusioner var 100,0 % (1724/1724; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %) (Tabel 57). For panelelementer med lavt niveau i målrettede RNA-fusioner var den samlede PPC 95,4 % (272/285; 95 % CI: 92,3 %, 97,3 %), og den samlede PNC var 100,0 % (1851/1851; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %).

Tabel 56 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af NTRK- og RET-fusioner i målrettede panelelementer med højt og lavt niveau

Variationsniveau	Målrettet fusion	N	Gennemsnitlige understøttende læsninger	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
~2-3 x LOD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alle fusioner Høj	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Alle fusioner Lav	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95 % dobbeltsidet konfidensinterval (CI) beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

Tabel 57 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af NTRK- og RET-fusioner i ikke-målrettede panelelementer med højt og lavt niveau

Variations niveau	Målrettede fusioner	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % CI ²
~2-3 x LOD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Alle fusioner - Høj	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Alle fusioner – Lav	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Alle observationer samlet fra variationskombinationer af panelelementer, for hvilke størstedelen af bestemmelserne er negative (målrettede variationer indeholdende variationer med mindre end 50 % positive bestemmelser).

² 95 % dobbeltsidet konfidensinterval (CI) beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

Tabel 58 viser varianskomponentanalysen af understøttende læsninger på tværs af ca. 36 observationer i hver målrettet fusion. SD og % CV (i alt og for hver kilde) blev beregnet og præsenteret for hver målrettet fusion.

Tabel 58 TSO Comprehensive (EU)-analysen – Varianskomponentanalyse af understøttende læsninger i panelelementer i målrettede RNA-fusioner

Variationsniveau	Fusion	N	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for sted (% CV)	SD for operatør (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for replikat (% CV)	SD i alt (%CV)
~2-3 x LOD	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9)	3,37 (9)	6,93 (18)	9,04 (24)	12,39 (33)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41)	7,87 (23)	5,40 (16)	8,95 (27)	18,98 (57)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33)	3,50 (14)	4,20 (17)	4,86 (20)	10,86 (44)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31)	4,24 (12)	6,82 (19)	6,87 (19)	15,57 (43)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20)	10,20 (18)	9,25 (16)	8,69 (15)	19,93 (35)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5)	2,65 (8)	2,16 (7)	10,47 (32)	11,11 (34)
	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13)	4,09 (11)	6,17 (17)	5,20 (14)	10,17 (28)
	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22)	2,56 (8)	6,53 (20)	5,51 (16)	11,49 (34)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13)	0,00 (0)	2,74 (20)	4,37 (32)	5,47 (40)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17)	2,98 (18)	4,61 (27)	5,82 (34)	8,52 (50)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0)	3,41 (22)	3,83 (25)	4,39 (29)	6,75 (45)
	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13)	0,61 (5)	2,33 (17)	2,57 (19)	3,95 (29)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24)	3,46 (14)	0,00 (0)	6,39 (26)	9,44 (38)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,64 (37)	6,71 (37)
	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13)	1,03 (7)	0,00 (0)	5,11 (32)	5,61 (36)
	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12)	0,00 (0)	1,58 (10)	5,83 (35)	6,39 (39)

Studie 2

Et andet studie blev udført for at vurdere reproducerbarheden af TSO Comprehensive (EU)-analysen på tværs af 3 testlaboratorier (2 eksterne og 1 internt), 2 operatører/instrumenter per laboratorium, 3 unikke reagenspartier, 4 testdage (ikke på hinanden følgende) og 2 sekventeringskørsler per prøvebibliotek.

Testen blev udført ved hjælp af ekstraherede DNA- og RNA-prøver fra 41 FFPE-vævsprøver og 1 FFPE-cellelinje (med 1 FFPE-vævsprøve og FFPE-cellelinje anvendt til at oprette 2 panelelementer hver). Vævsprøver bestod af følgende typer: blære, knogle, hjerne, bryst, tyktarm, jejunum, nyre, lever, lunge, ovarie, prostata, hud, blødt væv, mave, skjoldbruskkirtel og livmoder. I alt 44 panelelementer blev testet, inklusive DNA-panelelementer med små DNA-varianter (SNV'er, MNV'er, indsætninger og deletioner), genamplifikationer, forskellige TMB-vurderinger, høje MSI-vurderinger og RNA-panelelementer med fusioner og splejningsvariationer. De fleste panelelementer havde kendte målvariationer på niveauer, der var ca. 2 til 3 gange højere end den variationsspecifikke detektionsgrænse (~2-3xLoD).

LoD er den analytkoncentration, hvor observerede analyseresultater er positive (detekteret variation i forhold til skæringsværdien for TSO Comprehensive (EU)-analysen) $\geq 95\%$ af tiden. Observerede gennemsnitlige variationsniveauer blev kategoriseret som ca. $< 2 \times \text{LoD}$ (observerede variationsniveauer ved $< 1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ (observerede variationsniveauer ved $1,5 \times \text{LoD}$ til $3,4 \times \text{LoD}$) og ca. $> 3 \times \text{LoD}$ (observerede variationsniveauer ved $> 3,4 \times \text{LoD}$).

Procentdel af positive bestemmelser (PPC'er) for små DNA-variationer, genamplifikationer, MSI-høj (MSI-H) og RNA-variationer blev beregnet ved at kombinere observationer på tværs af sekventeringskørsler og laboratorier. På samme måde blev PNC'er beregnet for små DNA-variationer, genamplifikationer og RNA-variationer. For hver kendt målvariation blev observationer fra TSO Comprehensive (EU)-analysen i panelelementer af samme variationstype, men som indeholder andre variationer, der ikke er afledt fra samme kildeprøve, og som ikke overholder flertalsreglen for den pågældende variation (dvs. < 50 % af cellerne var positive) kombineret på tværs af laboratorier, operatører/instrumenter, dage, reagenspartier og sekventeringskørsler for at beregne PNC. Tosidede 95 % konfidensintervaller (CI'er) blev beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

Små DNA-variationer

Tabel 59 viser PPC'er for målrettede små DNA-variationer. PPC'er varierede fra 91,3 % for en BRAF SNV til 100 % for størstedelen af DNA-variationerne.

Tabel 59 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af små DNA-variationer i kombinerede, målrettede panelelementer

Observeret variationsniveau ¹	Varianttype	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (amino-syre)	Gennemsnitlig VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
~2-3x LoD	DELETION	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2-3x LoD	DELETION	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	INSERTION	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2-3x LoD	DELETION	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)

Observeret variationsniveau ¹	Varianttype	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (amino-syre)	Gennemsnitlig VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
~2-3x LoD	DELETION	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELETION	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INSERTION	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variationsniveau beregnet fra observeret gennemsnitlig variationsallelfrekvens.

² Gennemsnitlig variationsallelfrekvens beregnet fra observerede analyseresultater.

³ 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

PNC'er var 100 % på tværs af små DNA-varianter.

Tabel 60 viser varianskomponentanalysen af resultater for variationsallelfrekvenser (VAF) for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer med målrettede små DNA-variationer.

Tabel 60 Varianskomponentanalyse af VAF for målrettede små DNA-variationer

Målrettet variation (nukleotid)	N	Gennemsnitlig VAF	SD for sted (% CV)	SD for operatør (sted) (% CV)	SD for dag (sted, operatør) (% CV)	SD for parti (% CV)	SD for kørsel (% CV)	SD i alt (% CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	46	0,112	0,000 (0,0)	0,004 (3,8)	0,015 (13,7)	0,005 (4,1)	0,008 (6,9)	0,018 (16,3)
chr7_55259515_T_G	38	0,045	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,012 (27,3)	0,000 (0,0)	0,003 (6,8)	0,013 (28,8)
chr7_140453136_A_T	46	0,045	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (34,9)	0,000 (0,0)	0,006 (12,2)	0,017 (36,9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0,130	0,000 (0,0)	0,004 (2,9)	0,017 (13,4)	0,003 (2,6)	0,006 (4,9)	0,019 (14,8)
chr9_139399350_C_CG	48	0,146	0,015 (10,2)	0,000 (0,0)	0,012 (8,2)	0,000 (0,0)	0,004 (2,8)	0,020 (13,4)
chr10_89720798_GTACT_G	44	0,157	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,021 (13,6)	0,002 (1,6)	0,010 (6,4)	0,024 (15,3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0,111	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (16,8)	0,003 (2,5)	0,008 (7,3)	0,020 (18,5)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Der var to små målrettede DNA-variationer, for hvilke antallet af observationer var for lille til, at en varianskomponentmodel kunne tilpasses. For disse 2 målrettede variationer var samlede SD'er 0,027 for variation chr1_27024001_C_CG og 0,001 for variation chr17_7578470_C_CGGCGG.

Genamplifikationer

Tabel 61 viser PPC'er for målrettede genamplifikationer. PPC'er var 100,0 % for MET og 100,0 % for ERBB2.

Tabel 61 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af genamplifikationer i kombinerede, målrettede panelelementer

Observeret variationsniveau ¹	Målrettet variation	Observeret gennemsnitlig foldændring ²	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Variationsniveau beregnet fra observeret, gennemsnitlig foldændring.

² Gennemsnitlig foldændring beregnet fra observerede analyseresultater.

³ 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

PNC'er var 100 % på tværs af genamplifikationer.

Tabel 62 viser varianskomponentanalysen af resultater for foldændring for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer med målrettede genamplifikationer.

Tabel 62 Varianskomponentanalyse af foldændring for målrettede genamplifikationer

Målrettet variation	N	Gennemsnitlig foldændring	SD for sted (% CV)	SD for operatør (sted) (% CV)	SD for dag (sted, operatør) (% CV)	SD for parti (% CV)	SD for kørsel (% CV)	SD i alt (% CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabel 63 viser PPC'er for målrettede MSI-Høj-panelementer. PPC'er var 100 % for begge MSI-Høj-panelementer.

Tabel 63 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af MSI-Høj-status i kombinerede, målrettede panelelementer

Panelement	Gennemsnitlig MSI-score ¹	N	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Alle elementer		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Observeret gennemsnitlig MSI-score beregnet fra observerede analyseresultater.

² 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

Tabel 64 viser varianskomponentanalysen af resultater for MSI-score for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer målrettet for MSI-Høj-status.

Tabel 64 Varianskomponentanalyse af MSI-score for målrettede MSI-Høj-panelelementer

Panelement	N	Gennemsnitlig MSI-score	SD for sted (% CV)	SD for operatør (sted) (% CV)	SD for dag (sted, operatør) (% CV)	SD for parti (% CV)	SD for kørsel (% CV)	SD i alt (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

For at evaluere reproducerbarheden af TMB-scorer blev en kvantitativ analyse af scoren udført i målrettede TMB-panelementer, hvilket repræsenterede et interval af forventede TMB-scorer. Tabel 65 viser varianskomponentanalysen af resultater for TMB-score for hver kilde af variation og samlet variation i TMB-panelementerne. Samlede SD'er for TMB-score var 1,0 (%CV = 13) for ét panelement (gennemsnitlig TMB-score = 7,6) og 1,1 (% CV = 2) for et andet panelement (gennemsnitlig TMB-score = 63,2).

Tabel 65 Varianskomponentanalyse af TMB-score for målrettede TMB-panelementer

Panelement*	N	Gennemsnitlig TMB-score	SD for sted (% CV)	SD for operatør (sted) (% CV)	SD for dag (sted, operatør) (% CV)	SD for parti (% CV)	SD for kørsel (% CV)	SD i alt (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

* Der var 1 TMB-panelement, for hvilke antallet af observationer var for lille (N = 2) til, at en varianskomponentmodel kunne tilpasses. Den samlede SD for dette panelement var 1,7.

RNA-variationer

Tabel 66 viser PPC'er for målrettede RNA-variationer. PPC'er varierede fra 91,7 % for KIF5B-RET til 100 % for de fleste RNA-variationer.

Tabel 66 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af RNA-variationer i kombinerede, målrettede panelelementer

Observeret variationsniveau ¹	Variationstype	Målrettet variation	Gennemsnitlige understøttende læsninger ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
> 3x LoD	Fusion	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	Fusion	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
< 2x LoD	Fusion	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fusion	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Splejsnings variation	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	Splejsnings variation	Springer MET exon 14 over	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variationsniveau beregnet fra gennemsnitlige observerede understøttende læsninger.

² Gennemsnitlige understøttende læsninger beregnet fra observerede analyseresultater.

³ 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

PNC var 100 % for hver målrettet RNA-variation, med undtagelse af FGFR2-SRPK2-fusionen (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % CI: 98,96 % til 99,84 %).

Tabel 67 viser varianskomponentanalysen af resultater for understøttende læsninger for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer med målrettede RNA-variationer.

Tabel 67 Varianskomponentanalyse af understøttende læsninger for målrettede RNA-variationer

Målrettet variation	N	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for sted (% CV)	SD for operator (sted) (% CV)	SD for dag (sted, operator) (% CV)	SD for parti (% CV)	SD for kørsel (% CV)	SD i alt (% CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GPOC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII-splejningsvariation	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Springer MET exon 14-splejningsvariation over	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Intern laboratoriepræcision

Der blev udført to studier for at evaluere intralaboratoriepræcision for TSO Comprehensive (EU). Studie 1 evaluerede NTRK- og RET-fusioner og RET små DNA-variationer. Studie 2 evaluerede TMB og MSI.

Studie 1

Intralaboratoriepræcision blev evalueret for NTRK1-3-fusioner (lavgradsgliom, glioblastom, myofibroblastisk sarkom, sekretorisk brystkræft), RET-fusioner (thyreoideacancer og hudvæv fra en ukendt cancer) og RET-små DNA-variationer (medullær thyreoideacancer) med FFPE-væv fra de indicerede cancere. Hver af prøverne blev testet på to variationsniveauer: ~1x LoD (lavt variationsniveau) og ~2-3x LoD (højt variationsniveau) med

undtagelse af prøven indeholdende CCDC6-RET, der kun blev testet på det lave variationsniveau. Hver af prøverne på hvert testniveau blev kørt to gange i hver klargøring af bibliotek på tværs af tre (3) operatører. Hver operatør påbegyndte klargøring af bibliotek på tre (3) ikke på hinanden følgende startdage og sekventerede på tre (3) udpegede NextSeq 550Dx-instrumenter. Tre reagenspartier blev testet og genererede 54 observationer per niveau. Nogle niveauer havde færre end 54 observationer som følge af ugyldige biblioteker.

Kvalitativ analyse

Den kvalitative konkordans ved variationsbestemmelse blev evalueret separat for de to variationsniveauer for en given variation fra samlede observationer på tværs af alle variabler (operatører, reagenspartier, instrumenter, dage og replikater). Procentdelen af positive bestemmelser (PPC) og procentdelen af negative bestemmelser (PNC) og det tilknyttede to-sidede 95 % konfidensinterval (Wilson-score) er opsummeret i [Tabel 68](#) (små DNA-variationer) og [Tabel 69](#) (RNA-fusioner).

På det højeste variationsniveau (~2-3x LoD) påviste TSO Comprehensive (EU)-analysen 100 % for PPC og PNC for alle testede variationer.

På det laveste variationsniveau (~1x LoD) varierede PPC for små DNA-variationer fra 83,3 % til 98,1 %, og PPC for RNA-fusioner varierede fra 90,7 % til 100 %. For variationer med PPC < 95 % var de gennemsnitlige VAF'er (RET C634Y og RET D898_E901del) eller understøttende læsninger (NCOA4-RET og BCAN-NTRK1) under de respektive detektionsgrænser. På det laveste variationsniveau blev 100 % PNC opnået for alle variationer.

Tabel 68 Kvalitative resultater for målrettede DNA-variationer

Variationsniveau	Variation	Variationstype	Gennemsnitlig VAF	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3-91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELETION	0,048	87,0 (47/54) (75,6, 93,6)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,045	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET M918T	SNV	0,042	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	100,0 (216/216) (98,3, 100,0)
	RET D631_L633delinsE*	DELETION	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Variationsniveau	Variation	Variationstype	Gennemsnitlig VAF	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
(~3x LoD)	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELETION	0,088	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,146	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET M918	SNV	0,078	100,0 (52/52) (93,1, 100,0)	100,0 (194/194) (98,1, 100,0)
	RET D631_ L633delinsE*	DELETION	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Nukleotidændringer er anført for hver variation i afsnittet Detektionsgrænse, med undtagelse af RET D631_L633delinsE, der er kromosom 10, position 43609940, reference ACGAGCT, alternativ A.

Tabel 69 Kvalitative resultater for målrettede RNA-fusioner

Variationsniveau	Fusion	Gennemsnitlige understøttende læsninger	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE-cellelinje)	23,1	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	
	KANK1-NTRK3	13,5	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	NCOA4-RET	13,3	90,7 (49/54) (80,1, 96,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (prøve 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (prøve 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Variationsniveau	Fusion	Gennemsnitlige understøttende læsninger	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE cellelinje)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	I/T	Ikke testet	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (prøve 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (prøve 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvantitativ analyse

Variationsanalyse for begrænset maksimal sandsynlighed (REML) for komponenter blev udført for at evaluere samlet variation af den underliggende, kontinuerlige variabel (VAF for små DNA-varianter og understøttende læsninger for RNA-fusioner) og estimere præcisionskomponenterne [standardafvigelse (SD), variationskoefficient (CV)] for hver kilde af variation [operatører, instrumenter, dage, reagenspartier, rest og samlet]. Resultaterne vises i [Tabel 70](#) for små DNA-varianter og [Tabel 71](#) for RNA-fusioner.

Som forventet med en binomial andel steg variationen i VAF med gennemsnittet. Som forventet med optællingsdata steg variationen i understøttende læsninger med gennemsnittet. Restbestanddelen var den største medvirkende årsag til samlet varians for både små DNA-varianter og RNA-fusioner på begge niveauer, hvilket understøtter konklusionen om, at detektering af disse varianter ved hjælp af TSO Comprehensive (EU) er robust for både operatører, partier, instrumenter og dage.

Tabel 70 Kvantitative SD- og CV-resultater for målrettede små DNA-varianter

VAF-niveau	Variation	Variationstype	Antal gyldige forsøg	Gennemsnitlig VAF	SD for operatør (%CV)	SD for instrument (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for rest (%CV)	SD i alt (% CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELETION	54	0,048	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (8,7)	0,014 (30,0)	0,015 (31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (31,3)	0,014 (31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000 (0,0)	0,001 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (25,6)	0,011 (25,7)
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (3,3)	0,000 (0,0)	0,009 (30,7)	0,009 (30,9)
	RET D631_L633delinsE	DELETION	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
(~3x LoD)	RET D898_E901del	DELETION	54	0,088	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (1,4)	0,006 (7,0)	0,017 (19,2)	0,018 (20,5)
	RET C618R	SNV	54	0,146	0,003 (1,7)	0,000 (0,0)	0,020 (13,7)	0,002 (1,1)	0,018 (12,6)	0,027 (18,7)
	RET M918T	SNV	52	0,078	0,002 (3,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (9,1)	0,018 (23,1)	0,020 (25,0)
	RET C634Y	MNV	54	0,095	0,000 (0,0)	0,002 (2,5)	0,002 (2,1)	0,000 (0,0)	0,014 (15,0)	0,015 (15,3)
	RET D631_L633delinsE	DELETION	52	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

Tabel 71 Kvantitative SD- og CV-resultater for målrettede RNA-fusioner

Niveau af understøttende læsninger	Fusion	Antal gyldige forsøg	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for operatør (%CV)	SD for instrument (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for rest (%CV)	SD i alt (% CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (cellelinje)	54	23,1	4,55 (20)	1,18 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,73 (29)	8,21 (36)
	KANK1-NTRK3	54	13,5	0,74 (5)	0,11 (1)	1,09 (8)	0,00 (0)	4,22 (31)	4,42 (33)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,67 (13)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,67 (13)	5,09 (38)	5,61 (42)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,00 (0)	1,14 (6)	5,44 (29)	0,00 (0)	6,17 (33)	8,30 (44)
	KIF5B-RET (prøve 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (prøve 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Niveau af understøttende læsninger	Fusion	Antal gyldige forsøg	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for operatør (%CV)	SD for instrument (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for rest (%CV)	SD i alt (% CV)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (cellelinje)	54	28,3	7,93 (28)	1,02 (4)	0,00 (0)	0,00 (0)	9,05 (32)	12,08 (43)
	KANK1-NTRK3	54	39,2	5,10 (13)	0,00 (0)	4,78 (12)	0,00 (0)	9,44 (24)	11,74 (30)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,05 (12)	0,00 (0)	5,92 (24)	0,00 (0)	6,78 (27)	9,50 (38)
	KIF5B-RET (prøve 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (prøve 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studie 2

Intralaboratoriepræcision blev evalueret for TMB og MSI. Fem NSCLC FFPE DNA-prøver for TMB og syv CRC FFPE-prøver for MSI, inklusive både MS-stabil og MSI-høj, blev anvendt til at evaluere præcision på forskellige niveauer på tværs af score-intervallet. Hver af prøverne blev kørt to gange på tværs af tre operatører, tre dage med tre klargøringer af bibliotek for tre reagenspartier med tre NextSeq 550Dx-instrumenter og genererede 54 observationer per niveau.

Kvalitativ konkordans blev evalueret for MSI-status. TSO Comprehensive (EU)-analysen påviste 100 % konkordans for procentdelen af positive bestemmelser og procentdelen af negative bestemmelser for MSI-status. For TMB rapporterer TSO Comprehensive (EU)-analysen en TMB-score. Kvalitativ konkordans er ikke relevant.

Den samlede variation i TMB- og MSI-score blev sammen med bidraget fra kilden (instrumenter, operatører, partier, dage og rest) kvantificeret ved hjælp af en varianskomponentmodel på tværs af et scoreinterval. Standardafvigelsen (SD) og varianskoefficienten (CV) vises i [Tabel 72](#) for TMB og [Tabel 73](#) for MSI efter niveau. Nogle niveauer havde færre end 54 observationer som følge af ugyldige biblioteker.

Tabel 72 Kvantitative resultater for TMB-score, SD og CV

Niveau	Gennemsnitlig TMB-score	Antal gyldige forsøg	SD for operatør (%CV)	SD for instrument (%CV)	Parti SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterende SD (%CV)	Samlet standardafvigelse (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabel 73 Kvantitative resultater for MI-score, SD og CV

MSI-status	Niveau	Gennemsnitlig MSI-score (%)	Antal gyldige forsøg	Operator SD (%CV)	SD for instrument (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for rest (%CV)	Samlet standardafvigelse (%CV)
MS-stabil	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-høj	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

Variationen i TMB-scorer tenderer til at stige med gennemsnittet som forventet fra teoretiske fordelinger af optællingsdata. Variationen i MSI-scorer for niveauer nær MSI-score = 50 er højere end variationen i MSI-scorer tættere på 0 eller 100 i overensstemmelse med variabiliteten fra teoretiske fordelinger af andelsdata.

Restkomponenten forblev den største medvirkende årsag til samlet varians for både MSI- og TMB-scorer, hvilket understøtter konklusionen om, at scorerne er robuste for operatører, partier, instrumenter og dage. Idet både MSI og TMB er komplekse biomarkører, kan analytisk ydeevne imidlertid variere fra prøve til prøve. Det vil sige, at TMB-variation ikke kun afhænger af TMB-værdien, men også af sammensætningen af variationer i prøven, såsom variationstype (SNV, indel) og VAF-niveau (tæthed på inklusionsgrænsen). På samme måde afhænger MSI-variation ikke kun af MSI-værdien, men også af sammensætningen af stederne i prøven, såsom antallet af steder, der er ustabile og mængden af ustabilitet per sted.

C5- og C95-værdier i nærheden af skæringsværdien på 20,00 % blev bestemt for MSI ved hjælp af en præcisionsprofil ([Tabel 74](#)).

Tabel 74 C5-C95-intervaller for MSI

Score	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Tumorindholdets indvirkning på TMB- og MSI-scorer blev evalueret. For de fleste prøver havde et tumorindhold på ≥ 30 % en ubetydelig indvirkning på TMB-scorer over ca. 10 mutationer per megabase. TMB-scorer forblev relativt uændrede med øget tumorindhold. For MSI-høj-prøver udviste tumorindholdet en positiv, lineær korrelation med MSI-score. MSI-høj-prøver forblev i gennemsnit MSI-Høj ved et tumorindhold på ≥ 30 %. Endometrielle prøvers adfærd var markant anderledes end de andre vævstyper, og det blev konstateret, at en større mængde tumorindhold var påkrævet for at blive bestemt som MSI-Høj.

Præcision af tumorprofilering

Detektering af variationer ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne fra referencemetoderne. Små DNA-variationer og TMB blev sammenlignet med en eksternt valideret helt exom NGS-metode. Genamplifikationer blev sammenlignet med den samme NGS-metode eller valideret dobbelt in-situ hybridiseringsmetode (DISH) for HER2-amplifikationer. MSI blev evalueret i forhold til en valideret MSI-PCR-test. RNA-splejningsvariationer blev sammenlignet med en valideret, kvantitativ PCR (qPCR)-

metode. ROS1- og ALK-fusioner blev sammenlignet med validerede FISH-analyser. Alle andre fusioner blev sammenlignet med en sammensat metode, der bestod af en valideret NGS-analyse for helt RNA-exom (RNGS1), et målrettet NGS-panel (RNGS2) og ddPCR (droplet digital PCR).

Detektering af små DNA-variationer

Detekteringen af små DNA-variationer ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne af sekventering af helt exom (WES), der anvender WES med prøver med tumor og normal sat sammen til bestemmelse af kimceller og små somatiske variationer. Sammenligningen mellem små variationer, der består af enkeltnukleotidvariationer (SNV'er), insertioner og deletioner, var baseret på 124 prøver fra 14 forskellige vævstyper, der var valideret for både TSO Comprehensive (EU) og WES. TSO Comprehensive (EU), men ikke WES-analysen, kan detektere multinukleotid-variationer (MNV'er, 2-3 bp), som kræver fasebestemmelse. TSO Comprehensive (EU) MNV'er blev evalueret som individuelle SNV'er i forhold til WES. En oversigt over konkordans på variationsniveau, inklusive positiv procentvis overensstemmelse (PPA) og negativ procentvis overensstemmelse (NPA) for alle variationsbestemmelser, vises i [Tabel 75](#).

Tabel 75 Oversigt over konkordans for bestemmelse af små variationer evalueret efter kimcelle eller somatisk status

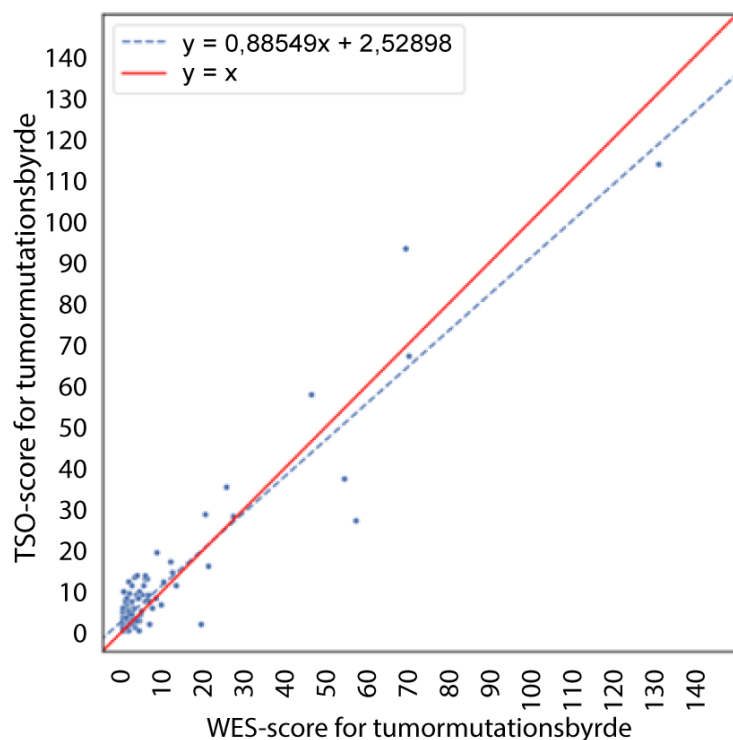
	WES, somatisk bestemt	WES, kimcelle bestemt	WES, ikke bestemt
TSO Comprehensive (EU) bestemt	382	33.163	426
TSO Comprehensive (EU) ikke bestemt	69	61	70.000.481
I alt	451	33.224	70.000.907
Procentvis overensstemmelse	PPA: 85 % (382/451), 95 % CI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33.163/33.224) 95 % CI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70.000.481/70.000.907) 95 % CI: [99,999 %, 99,999 %]

I alt bestemte TSO Comprehensive (EU) 426 somatiske variationer, der ikke blev detekteret i WES-metoden. 204 (48 %) af disse variationer havde variationsallelfrekvenser, der var under tærsklen for bestemmelse i henhold til WES-metoden. Af de resterende falsk positive variationer var der evidens for variationsbestemmelsen i henhold til WES-metoden med lav understøttelse. Derudover havde mange af variationerne et meget lavt niveau af WES-evidens i de tilsvarende normale prøver. Dette resultat antyder, at disse variationer blev overset i tumoren af WES på grund af tumor i normal kontamination.

Detektering af tumormutationsbyrde

TMB-konkordans blev bestemt ved at sammenligne TMB-scorer (somatiske mutationer/megabase) mellem WES-metoden og TSO Comprehensive (EU) for 124 prøver med tilgængelige data fra både TSO Comprehensive (EU) og WES. Lineær regressionsanalyse med WES som prædiktor havde et y-skæringspunkt på 2,53, en hældning på 0,89 og en Pearsons korrelationskoefficient på 0,94 ([Figur 3](#)).

Figur 3 TMB-score-korrelation mellem WES og TSO Comprehensive (EU)



Detektering af genamplifikation

Detektering af genamplifikationer ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne af den samme WES-analyse ved anvendelse af enten prøver med tumor sat sammen med normal eller prøver kun med tumor. Der var i alt 420 prøver, hvoraf 183 brugte metoden ortogonal tumor/normal og 237 brugte metoden udelukkende med tumor. Af de 420 prøver blev 50 prøver udvalgt til undersøgelsen, fordi de var amplifikationspositive med TSO Comprehensive (EU) eller en forgængeranalyse. Ydeevnen for disse karakteriserede prøver blev justeret ved hjælp af en gennemsnitlig fusionsprævalens. Den kombinerede ydeevne på tværs af karakteriserede og ukarakteriserede prøver brugte et omvendt varieret vægtet gennemsnit. Prøverne var fra 14 vævstyper og indeholdte amplifikationer fra 55 gener. TSO Comprehensive (EU) rapporterer genamplifikationer fra MET- og ERBB2-generne. Nøjagtigheden blev imidlertid vurderet for alle 55 gener. En oversigt over genamplifikationsbestemmelserne vises i [Tabel 76](#).

Tabel 76 Sammenfatning af overensstemmelse for genamplifikationer

PPA (95 % CI*)	NPA (95 % CI*)
88,80 % (84,61, 92,43)	99,02 % (98,93, 99,12)

* Konfidensinterval beregnet ved bootstrap.

ERBB2 (HER2) amplifikationer i gastrisk væv og brystvæv blev analyseret adskilt fra andre genamplifikationer ved hjælp af en dobbelt in-situ-hybridiseringsmetode (DISH). I alt blev 116 prøver med brystvæv og gastrisk væv, hvoraf 64 tidligere var blevet karakteriseret som HER2-positive ved hjælp af IHC eller FISH, testet. Én prøve bestod ikke ekstraktion, 4 prøver bestod ikke validitet for TSO Comprehensive (EU), og 3 prøver bestod ikke validitet for DISH-analysen. Ud af de 108 prøver havde 20 (18,5 %) borderline-scorer (mellem 1,5 og 2,5) nær DISH-skæringsværdien på 2,0. Konkordansresultater, inklusive PPA, NPA for alle prøver og uden borderline HER2 DISH-tilfælde, vises i [Tabel 77](#).

Tabel 77 Oversigt over konkordans mellem TSO Comprehensive og HER2 DISH, inklusive for HER2-genamplifikation

HER2-genamplifikation Alle (bryst og gastrisk)	HER2 DISH, amplificeret	HER2 DISH, ikke amplificeret
TSO Comprehensive (EU) positive	17 (inklusive 1 borderline)	13 (inklusive 1 borderline)
TSO Comprehensive (EU) negative	10 (inklusive 6 borderline)	68 (inklusive 12 borderline)
Procentvis overensstemmelse, inklusive borderline-tilfælde	PPA: 63 % (17/27) 95 % CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % CI: [74 %, 90 %]
Procentvis overensstemmelse, uden borderline-tilfælde	PPA: 80 % (16/20) 95 % CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % CI: [72 %, 90 %]

Detektering af mikrosatellit-instabilitet

Detektering af mikrosatellit-instabilitet ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne af en valideret MSI-PCR-test, der anvender prøver med tumor sat sammen med normal til test. I alt 195 prøver, der opfyldte kravet til tumorindhold på ≥ 30 % (for MS-stabil status) og repræsenterede 14 vævstyper, blev sammenlignet. MSI-PCR evaluerer 5 steder og har 3 resultater – MSI-stabil (ingen ustabile steder), MSI-lav (et ustabil sted) og MSI-høj (MSI-H) (to eller flere ustabile steder). TSO Comprehensive (EU) evaluerer op til 130 mikrosatellit-steder og klassificerer kun prøver som MS-stabil eller MSI-høj (≥ 20 % ustabile steder). MSI-Low (MSI-Lav) blev grupperet med MS-stabil-resultater for MSI-PCR. Konkordansanalyse vises i [Tabel 78](#).

Tabel 78 Oversigt over konkordansanalyse mellem TSO Comprehensive (EU) og MSI-PCR for mikrosatellit-instabilitet for DNA

MSI-status	PCR MSI-High (MSI-Høj)	PCR MSI-Low (MSI-Lav)	PCR MSI-stabil
TSO Comprehensive (EU) Ustabil (MSI-høj)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabil (MS-stabil)	3	0	150
I alt	44	2	150
Procentvis overensstemmelse	PPA: 93 % (41/44) 95 % CI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % CI: [95 %, > 99 %]	

Detektering af RNA-splejsningsvariationer

Nøjagtighed for detektering af splejsningsvariation blev beregnet ved at sammenligne TSO Comprehensive (EU) resultater med qPCR-analyser for EGFRvIII og MET Exon 14, inklusive ét kendt, positivt RNA for hver af splejsningsvariationerne. Konkordansanalyse blev udført på i alt 230 unikke FFPE RNA-prøver fra 14 vævstyper med tilgængelige data fra både TSO Comprehensive (EU) og referencemetoden. Alle prøver blev testet for overspring af MET exon 14, mens EGFRvIII kun blev testet i hjernevæv. Tre prøver, der blev bestemt positive for overspring af MET Exon 14 af qPCR, men ikke af TSO Comprehensive (EU), havde gennemsnitlig Ct > 37 og var under TSO Comprehensive (EU) LoD-niveauet. [Tabel 79](#) opsummerer resultaterne af konkordansundersøgelsen.

Tabel 79 Oversigt over konkordansanalyse mellem TSO Comprehensive (EU) og qPCR-analyse for RNA-splejsningsvariationer

RNA-splejsningsvariationer	qPCR, positiv	qPCR, negativ
TSO Comprehensive (EU) positive (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) negative (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) positive (Springer MET exon 14 over)	1	0
TSO Comprehensive (EU) negative (Springer MET exon 14 over)	3	217
I alt	7	230
Procentvis overensstemmelse	PPA: 57 % (4/7) 95 % CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % CI: [98 %, 100 %]

Detektering af RNA-fusion

Sammenligning med en sammensat metode

TSO Comprehensive (EU) fusioner blev sammenlignet med en sammensat metode, der bestod af sekventering af et helt RNA-exom ved hjælp af et NGS-panel (RNGS1), et målrettet NGS-fusionspanel (RNGS2) og ddPCR (droplet digital PCR).

RNGS1-metoden overlapper med alle de gener, for hvilke TSO Comprehensive (EU) kan detektere fusioner. Grænsen for detektering ved hjælp af RNGS1-metoden var imidlertid 4-8 gange højere end TSO Comprehensive (EU) baseret på antallet af understøttede læsninger i de overlappende fusionsbestemmelser. Således blev en sammensat metode, der anvender to yderligere metoder med højere følsomhed men mindre bredde for fusioner, anvendt sammen med WES (RNGS1)-metoden.

I alt blev 255 unikke RNA-prøver, der repræsenterede 14 vævstyper og bestod TSO Comprehensive (EU)-målinger, testet med RNGS1. To prøver var ugyldige i kvalitetskontrollen af RNGS1-prøven og blev udelukket fra yderligere analyse. Ud af de 82 fusioner bestemt ved hjælp af TSO Comprehensive (EU) blev 4 udelukket fra evaluering som følge af, at RNGS1-prøven ikke bestod kvalitetskontrollen, og yderligere 7 fusioner kunne ikke bestemmes som følge af fravær af mål i RNGS1-panelet. Ud af de resterende 71 fusioner bestemt ved hjælp af TSO Comprehensive (EU) bekræftede RNGS1 9 fusioner. RNGS1 bestemte 4 fusioner, der ikke blev bestemt ved hjælp af TSO Comprehensive (EU).

Ud af de 62 fusioner, der var TSO Comprehensive (EU)-positive og ikke blev detekteret af RNGS1, overlappede 13 og blev bekræftet af RNGS2. Én fusion blev bestemt af RNGS2, men ikke af TSO Comprehensive (EU).

Droplet digital PCR blev herefter anvendt til fusionsbestemmelse af TSO Comprehensive (EU), der ikke blev eller ikke kunne bestemmes af RNGS1, og som ikke kunne vurderes af RNGS2 (49). Derudover blev ddPCR anvendt til at revurdere 2 af de 4 falske negative fusioner for TSO Comprehensive (EU) med RNGS1 og 2 ud af 9 overensstemmende fusioner for TSO Comprehensive (EU) og RNGS1. Fem negative fusionsprøver blev inkluderet i testen af hver positiv fusionsprøve for at sikre specificitet. 18 fusioner blev ikke testet som følge af manglende mulighed for at designe primere/prober, flere genpartnere for fusionen eller utilstrækkeligt resterende FFPE-materiale. For ddPCR blev primere og prober designet i forhold til de observerede brudpunkter i TSO Comprehensive (EU)-analysen.

I alt blev 52 fusioner detekteret af ddPCR, hvoraf 41 blev bestemt af TSO Comprehensive (EU), men ikke blev eller ikke kunne bestemmes af RNGS1. Ni fusioner blev bestemt af ddPCR, men var negative i TSO Comprehensive (EU) eller RNGS1. To ddPCR-positive fusioner bekræftede de 2 overensstemmende fusioner for TSO Comprehensive (EU) og RNGS1. Ingen fusion blev detekteret af ddPCR for de 2 revurderede TSO Comprehensive (EU) falske negative med RNGS1. Disse blev imidlertid talt som falske negative baseret på RNGS1-sammenligningen.

Af de 255 prøver blev 35 prøver udvalgt til studiet, fordi de var fusionspositive med TSO Comprehensive (EU) eller en forgængeranalyse. Ydeevnen for disse karakteriserede prøver blev justeret ved hjælp af en gennemsnitlig fusionsprævalens. Den kombinerede ydeevne på tværs af karakteriserede og ukarakteriserede prøver brugte et omvendt varieret vægtet gennemsnit. Konkordansresultaterne for de sammensatte metoder for fusioner vises i [Tabel 80](#).

De 66 fusioner (54 unikke fusioner), der stemte overens med den sammensatte metode, repræsenterede 43 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet. Fusioner er imidlertid kun egnede til rapportering fra 23 af de gener, der er indikeret i [Tabel 80](#).

Tabel 80 Sammenfatning af overensstemmelse for RNA-fusioner

PPA (95% CI*)	NPA (95 % CI*)
80,38 % (64,20, 92,32)	99,96 % (99,94, 99,98)

* Konfidensinterval beregnet ved bootstrap.

Sammenligning med FISH-metoden for ROS1- og ALK-fusioner

25 NSCLC-prøver blev testet ved hjælp af FISH for både ROS1- og ALK-fusioner, og 5 yderligere NSCLC-prøver blev undersøgt for ROS1-fusioner. Otte prøver bestod ikke FISH for ROS1 som følge af utilstrækkeligt væv. To ROS1-fusioner og én ALK-fusion blev detekteret af både TSO Comprehensive (EU) og FISH. Der blev ikke observeret uoverensstemmende resultater. [Tabel 81](#) opsummerer konkordansresultaterne af TSO Comprehensive (EU) og FISH-metoden for ROS1- og ALK-fusioner.

Tabel 81 Oversigt over konkordansresultaterne af TSO Comprehensive (EU) og FISH-metoden for ROS1 og ALK-fusioner

ALK+ROS1	FISH positiv	FISH negativ
TSO Comprehensive (EU) positive	3	0
TSO Comprehensive (EU) negative	0	44
I alt	3	44
Procentvis overensstemmelse	PPA: 100 % (3/3) 95 % CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % CI: [92 %, 100 %]

Prøvevaliditet

Prøvevaliditet (første forsøg) blev målt for 181 unikke RNA- og 272 unikke DNA-prøver fra FFPE-blokke ≤ 5 år. Disse prøver blev udvalgt baseret på vævstype og tilgængeligt materiale, analysevaliditeten var ukendt. For at en variationstype kan anses for at være gyldig, skal biblioteket bestå målinger for kvalitetskontrol. Prøvevaliditeten blev evalueret separat for hver af variationstyperne (små DNA-varianter/TMB, MSI, genamplifikationer, fusioner, splejsningsvariationer) og vises i [Tabel 82](#). Et yderligere fald i MSI-gyldigheden på 1 % for FFPE-blokke ≤ 2 år på grund af reagensforsendelse forudsiges.

Tabel 82 Prøvevaliditet

Variationstype	Prøvevaliditet
Fusioner/splejsnings variationer (RNA)	76 %
Små DNA-varianter/TMB	75 %
MSI	72 %
Gen amplifikation	94 %

Oversigt over analytisk validering for påstande om tumorprofiler

Baseret på detektionsgrænse, præcision, reproducerbarhed og nøjagtighedsdata er TSO Comprehensive (EU) analytisk valideret til følgende:

- Små DNA-varianter – SNV'er, MNV'er, insertioner og deletioner.
- TMB
- MSI
- MET og ERBB2 (HER2) genamplifikationer (se [Tabel 2](#)).
- 23 gener, for hvilke fusioner kan detekteres (se [Tabel 2](#)).
- EGFR- og MET-splejsningsvarianter (se [Tabel 2](#)).

Klinisk NTRK-ydeevne

For at validere TSO Comprehensive (EU)-analysen som en ledsagende diagnosticering (CDx) til udvælgelsen af patienter til behandling med VITRAKVI (larotrectinib), blev prøver fra patienter tilmeldt i de kliniske prøver af larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, der samlet omtales som larotrectinib-prøverne) ved hjælp af en dataskæringdato den 15. juli 2019, suppleret af FFPE-vævsprøver fra kommercielle kilder, testet til at understøtte et TSO Comprehensive (EU)-analysepræcisionsstudie og klinisk brodnelsesstudie.

NCT02122913 var et multicenter, ikke-blindet, fase 1, dosiseskaleringsstudie hos voksne patienter med avancerede solide tumorer (all-comers) uselektet for NTRK-fusionspositiv cancer. Efter dosiseskaleringsdelen af studiet startede en dosisudvidelse for patienter med dokumenteret NTRK-fusionspositiv cancer og for patienter, som undersøgeren mente, kunne drage fordel af en yderst selektiv TRK-inhibitor. NAVIGATE NCT02576431 er et igangværende, multicenter, ikke-blindet, fase 2, kurvestudie hos patienter i alderen 12 år og ældre med tilbagevendende, avancerede, solide tumorer med en dokumenteret NTRK-fusion som vurderet af et eksternt laboratorium. SCOUT NCT02637687 er et igangværende, multicenter, ikke-blindet, fase 1/2-studie i pædiatriske patienter i alderen fra fødsel til 21 år med avancerede, solide tumorer eller tumorer i det primære centralnervesystem (CNS).

Af de NTRK-fusionspositive patienter inkluderet i TSO Comprehensive (EU)-analysestudiet dannede 164 det udvidede primære effektivitetssæt for larotrectinib (ePAS4).

Præcisionsstudie for NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusionsdetektion

Præcisionen af TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af NTRK-fusioner (NTRK1, NTRK2 eller NTRK3) i patienter med solide tumorer blev demonstreret ved at vurdere konkordansen af NTRK-fusionsresultater mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og en valideret ortogonal metode baseret på NGS).

Der blev udført et retrospektivt ikke-interventionsforsøg. Larotrectinib-prøver og supplerende prøver blev testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen på 1 eksternt forsøgssted med en ortogonal metode på et centralt laboratorium. Præcisionen af TSO Comprehensive (EU)-analysens NTRK-fusionbestemmelser blev anslået relativt til den ortogonale metode; positiv procentoverensstemmelse (PPA), negativ procentoverensstemmelse (NPA) og de tilknyttede tosidede 95 % konfidensintervaller (CIs) blev beregnet.

Der var 516 testede prøver med TSO Comprehensive (EU)-analysen og/eller den ortogonale metode. Af disse prøver blev 499 testet efter begge metoder. 17 af de 516 prøver blev ikke testet med en af analyserne pga. mislykket ekstraktion, ukendt årsag (for den ortogonale metode) eller protokolafvigelse. Af de 499 testede prøver efter begge metoder, var 170 (34,1 %) larotrectinib-prøver og 329 (65,9 %) var supplerende prøver.

En krydstabulering af resultater for de 499 prøver vises i [Tabel 83](#). Af de 499 prøver havde 85 prøver ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater. Af disse 85 havde 53 også ugyldige resultater med den ortogonale metode. Yderligere syv prøver havde ugyldige ortogonale metoderesultater. Således havde 407 af 499 prøver gyldige resultater efter begge metoder.

Tabel 83 NTRK-præcisionsstudie: Krydstabulering af TSO Comprehensive (EU) resultater i forhold til resultater fra ortogonal metode til detektering af NTRK-fusioner

TSO Comprehensive (EU)- analyseresultat	Resultat efter ortogonal metode			
	NTRK-f usion positiv	NTRK-f usion negativ	Ugyldig	I alt
NTRK-fusion positiv	114	16	1	131
NTRK-fusion negativ	4	273	6	283
Ugyldige*	4	28	53	85
I alt	122	317	60	499

* Ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater kommer fra prøver og kørselsniveau.

Overensstemmelsesanalyserne, eksklusive og inklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater, vises i [Tabel 84](#). Eksklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater var PPA 96,6 % (114/118; 95 % CI: 91,5 %-99,1 %), og NPA var 94,5 % (273/289; 95 % CI: 91,2 %-96,8 %).

Tabel 84 NTRK-præcisionsstudie: PPA og NPA for TSO Comprehensive (EU)-analysen sammenlignet med resultater fra ortogonal metode til detektering af NTRK-fusioner

Overensstemmelsesmåling	Eksklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater		Inklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater	
	Overensstemmelse, % (n/N)	95 % CI*	Overensstemmelse, % (n/N)	95 % CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

* 95 % CI baseret på (nøjagtig) Clopper-Pearson-metode.

Klinisk brodannelsestudie for NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusionsdetektion

Den kliniske validitet af TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af NTRK1-, NTRK2- eller NTRK3-fusioner i patienter med solide tumorer, som kan drage fordel af behandling med larotrectinib, blev demonstreret i et klinisk brodannelsestudie. Studiet blev udført for at vurdere den kliniske effektivitet af TSO Comprehensive (EU)-analysen til at identificere NTRK1-, NTRK2- eller NTRK3-fusionspositive patienter til behandling med larotrectinib og vurdere overensstemmelse mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og lokale test (LT)-metoder (der bruges til at fastlægge NTRK-fusionsstatus for de kliniske prøver med larotrectinib).

LT-metoder omfatter NGS, fluorescent-in-situ-hybridisering (FISH), polymerase kædereaktion (PCR) og NanoString-analyser. NTRK-fusioner (ETV6 NTRK3) blev udledt for patienter med infantil fibrosarcoma, som havde en dokumenteret ETV6-translokation identificeret af FISH. De fleste af de 235 patienter i larotrectinib-forsøget med kendt NTRK-fusionsstatus var blevet testet med NGS-metoder.

Per dataskæringsdatoen 15. juli 2019 var 279 patienter tilmeldt. Af de 279 patienter var 208 NTRK-fusionspositive. Af de 208 positive patienter dannede 164 larotrectinib ePAS4.

Det primære endepunkt for larotrectinib-effektivitetsanalysen var samlet responsfrekvens (ORR) i henhold til en uafhængig bedømmelseskommité (IRC) vurdering i et samlet datasæt fra de tre kliniske studier. ORR blev vurderet på basis af den del af patienter med bedst samlet reaktion til bekræftet fuld reaktion eller bekræftet delvis reaktion på basis af RECIST, version 1.1-kriterier. ORR i larotrectinib ePAS4'en var 72,6 % (95 % CI [65,1 %, 79,2 %]) og omfattede patienter med 16 forskellige tumortyper.

Prøveopgørelse

Prøvesættet omfattede repræsentation af en lang række tumortyper og pædiatriske og voksne patientprøver.

Der var 279 patienter tilmeldt i larotrectinib-studierne pr. 15. juli 2019. Af disse havde 235 patienter kendt NTRK-fusionsstatus som fastlagt af en LT-metode: 208 var positive og 27 var negative. For 44 patienter var NTRK-fusionsstatus ukendt, da test ikke var påkrævet for patientegnethed i dosis-eskaleringsfasen for NCT02122913- og SCOUT NCT02637687-studierne. I TSO Comprehensive (EU)-analysens kliniske

brodannelsestudie var prøver fra larotrectinib-prøvepatienter tilmeldt per 15. juli 2019 med kendt NTRK-fusionsstatus (208 positive patienter og 27 negative patienter) og de supplerende prøver fastlagt til at være NTRK-fusionsnegative efter repræsentative LT-metoder, egnede til dette studie.

Af de 208 positive larotrectinib-prøver havde 154 en prøve, som var tilgængelig for TSO Comprehensive (EU)-analysetest. Af disse havde 138 gyldige resultater. Femten prøver var ugyldige på grund af fejlede kvalitetsmålinger ved prøvesekventering, og en prøve blev ikke testet på grund af en protokolafvigelse. Af de 27 negative larotrectinib-prøver havde 24 en prøve, som var tilgængelig for test. Af disse havde 22 gyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater. To prøver var ugyldige på grund af fejlede kvalitetsmålinger ved prøvesekventering.

Supplerende prøver blev screenet ved hjælp af en af to repræsentative LT-metoder. Mere end 350 prøver blev anskaffet og undersøgt for tumorindhold. Af de supplerende prøver, som opfyldte prøvekravene, var 266 korrekt ekstraheret og bekræftet at være NTRK-fusionsnegative efter en repræsentativ LT-metode. Af disse var 260 tilgængelige til TSO Comprehensive (EU)-analysetest, hvoraf 222 havde gyldige resultater. Der var 38 ugyldige prøver, som var ugyldige på grund af fejlede sekventeringsmålinger (n = 25) eller fejlet kørselssekventering (n = 13). Det samlede NTRK-fusionsnegative sæt bestod af 222 supplerende prøver og 22 larotrectinib-prøver.

Konkordansresultater

I alt blev 437 prøver testet af TSO Comprehensive (EU). Blandt de 208 NTRK-fusionspositive patienter var der 153, som havde tilgængelige prøver og blev testet af TSO Comprehensive (EU), hvilket gav 138 gyldige resultater og 15 ugyldige resultater.

Overensstemmelse af TSO Comprehensive (EU) resultater relativt til LT-metoderesultater med og uden ugyldige TSO Comprehensive (EU) resultater vises i [Tabel 85](#).

Tabel 85 Klinisk NTRK-brodannelsestudie: Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive (EU)-analyse- og LT-metoder til detektion af NTRK-fusioner

Overensstemmelsesmåling	Eksklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater		Inklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater	
	% overensstemmelse (n/N)	95 % CI*	% overensstemmelse (n/N)	95 % CI*
PPA	89,1 (123/138)	82,7, 93,8	80,4 (123/153)	73,2, 86,4
NPA	96,3 (235/244)	93,1, 98,3	82,7 (235/284)	77,8, 87,0
OPA	93,7 (358/382)	90,8, 95,9	81,9 (358/437)	78,0, 85,4

* Det to-sidede 95 konfidensinterval er beregnet med den (nøjagtige) Clopper-Pearson-metode.

Følsomhedsanalyse i forhold til manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater demonstrerede robustheden af overensstemmelsesanalysen. Manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater for LT NTRK-fusionspositive patienter (n = 70) blev tilskrevet ved hjælp af en logistisk regressionsmodel. Overensstemmelsesoverslag, herunder de tilskrevne værdier vises i [Tabel 86](#).

Tabel 86 Klinisk NTRK-brodannelsesstudie: Konkordans mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metoder til påvisning af NTRK-fusioner, herunder tilskrevne værdier for LT-positive patienter med manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater

Overensstemmelsesmåling	% overensstemmelse	95 % CI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater for LT-fusionsnegative patienter blev ikke tilskrevet.

* Det to-sidede 95 % konfidensinterval er beregnet baseret på multipel tilskrivnings-Boot-metode. Den multiple tilskrivnings-Boot-metode er et bootstrap-trin indlejret i den multiple tilskrivning (Schomaker and Heumann 2018).

Overensstemmelser mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT'er efter metodetype (f.eks. RNA NGS, FISH) vises i [Tabel 87](#).

Tabel 87 Klinisk NTRK-brodannelsesstudie: Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive (EU)-analyse- og LT-metoder til detektion af NTRK-fusioner efter LT-metodetyper

LT-metodetype	Overensstemmelsesmåling	% overensstemmelse (n/N)	95 % CI ¹
DNA NGS	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
RNA NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Ikke beregnet (1/1)	Ikke beregnet
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Ikke beregnet (0/0)	Ikke beregnet
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Ikke beregnet: for undergrupper med prøveantal < 5 blev overensstemmelsesstatistikker ikke beregnet.

¹ Det to-sidede 95 % konfidensinterval er beregnet med den (nøjagtige) Clopper-Pearson-metode.

² Omfatter NGS-metoder, som kun bruger RNA og både DNA og RNA.

Af de 437 testede prøver med TSO Comprehensive (EU)-analysen havde 24 uoverensstemmende resultater i forhold til LT'er: 15 var positive efter LT'er og negative efter TSO Comprehensive (EU)-analysen, og 9 var negative efter LT'er og positive efter TSO Comprehensive (EU)-analysen. Af de 24 prøver med uoverensstemmende resultater blev 8 testet med en DNA NGS LT-metode, 14 med en RNA NGS LT-metode og 2 med FISH.

En valideret uafhængig NGS-metode bekræftede TSO Comprehensive (EU)-analyseresultaterne i 14 af de 24 prøver med uoverensstemmende resultater. Af de 10 resterende prøver var TSO Comprehensive (EU)-analyseresultaterne uoverensstemmende efter både LT-metoden og den uafhængige NGS-metode.

Kliniske effektivitetsresultater

Inden for ePAS4-kohorten lignede effektiviteten af larotrectinib i TSO Comprehensive (EU) positiv, LT positiv population (97 patienter, ORR=78,4, 95 CI [68,8, 86,1]) effektiviteten af larotrectinib i den samlede ePAS4-population (164 patienter, ORR=72,6, 95 CI [65,1, 79,2]) (Tabel 88). Af de 97 TSO Comprehensive (EU) positive patienter i ePAS4, havde 28 (28,9 %) patienter opnået en fuld reaktion/kirurgisk fuld reaktion, og 48 (49,5 %) patienter havde opnået en delvis reaktion.

Af de 13 TSO Comprehensive (EU) negative, LT-positiv population, viste 1 (7,7 %) fuld reaktion og 2 (15,4 %) viste delvis reaktion med larotrectinib-terapi.

Tabel 88 Klinisk NTRK-brodannelsesstudie: ORR for LT-positive patienter efter LT og TSO Comprehensive (EU) resultater i ePAS4

		LT-fusions positive N=164	TSO Comprehensive (EU) Positive og LT-positive N=97	TSO Comprehensive (EU) Negative og LT-positive N=13
Bedste samlede reaktion, n (%)	Fuld reaktion	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Kirurgisk fuld reaktion	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Delvis reaktion	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabil sygdom	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progressiv sygdom	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Kan ikke evalueres	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Samlet reaktionsfrekvens	Antal patienter, n	164	97	13
	Antal patienter med CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95 % CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Forkortelser: Forkortelser: CR = Complete Response (fuld reaktion), PR = Partial Response (delvis reaktion), sCR = Surgical Complete Response (kirurgisk fuld reaktion).

* Det to-sidede 95 % konfidensinterval er beregnet med den (nøjagtige) Clopper-Pearson-metode.

54 patienter har manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater.

Data fra dette studie understøtter sikkerheden og effektiviteten af TSO Comprehensive (EU)-analysen, når den bruges til at identificere patienter med solide tumorer med NTRK-fusioner, som kan være egnede til behandling med larotrectinib.

Referencer

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Tilgået 3. oktober 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Tilgået 3. oktober 2016.

Revideringshistorik

Revidering	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200007789 v08	Maj 2025	Fjernede henvisning til softwareversioner og delnumre. Opdatering af procedures begrænsninger: • Oplysninger om nekrotisk væv. • Oplysninger om MSI-tumorindhold. Opdatering: • NTC-fodnote skal gælde for både min. og maks. biblioteker. • Udstyr og materialer angiver specifikationer for pladecentrifuge og pipettetrin. • Beregning af SPB-overskud fra 1,05x til 1,15x. • Springer terminologi for MET exon 14 del til MET exon 14 over. Tilføjelse: • Bemærkning til SMB i Indfang Targets One and Two. • Gør klar til introduktion af sekventering. • Yderligere oplysninger om ultrasonikatorens. Tilføjede præciseringer og opdaterede resultater for karakteristika af ydeevne: • Interfererende stoffer. • Nøjagtighed for tumorprofilering og prøvegyldighed. • Detektionsgrænse i studie 1 og 2. • Intern laboratoriepræcision i studie 1. • Reproducerbarhed i studie 2. • Oplysninger om biblioteksstabilitet og biblioteksopbevaring. • Blindgrænse. Opdaterede sprog og grammatik.

Revidering	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200007789 v07	Januar 2024	- Tilføjede oplysninger til procedures begrænsninger: - Krav til prøve af nekrotisk væv og tumorindhold for MSI-høj og somatiske drivermutationer. - Potentiel interferens fra hæmoglobin. - Detektionsgrænser i RET-genet og fusionsbestemmelse uden for annoterede gengrænser. - Sletning af gener rapporteres ikke. - Opdaterede til brug med TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager-softwareversion 2.3.7. - Tilføjede oplysninger til det krævede men ikke leverede udstyr og materialer, herunder to yderligere ultralydskonfigurationer. - Opdaterede prøveoplysninger: - Indhold af nekrotisk væv. - Virkninger af proteinase K og hæmoglobin. - Opbevaring af FFPE og oprenset nukleinsyre monteret på objektglas. - Tilføjede oplysninger for at forbedre reagenshåndtering, arbejdsgang og fejlfinding af QC-fejl i kørsel. - Tilføjede kontekst og klarhed til karakteristika af ydeevne: - Krydskontaminering - Evalueret af sæt til nukleinsyreekstraktion - Interfererende stoffer - Nukleinsyre- og objektglasmonteret FFPE-stabilitet - Klinisk NTRK-ydeevne - Opdaterede sprog og grammatik
Dokumentnr. 200007789 v06	Februar 2023	- Yderligere anvisninger i afsnittet Begrænsninger - Sprogopdateringer for konvention, grammatik og klarhed - Rettelse af tabel 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Anvisning vedr. tilstedeværelse af bundfald i FSM-reagens - Opdaterede specifikationer for termocykler og skåle på listen over udstyr og materialer
Dokumentnr. 200007789 v05	September 2022	Opdaterede reproducerbarhedstabeller i studie 2
Dokumentnr. 200007789 v04	Juni 2022	- Tilføjede delnumre for TSO Comprehensive-analysemodul v2.3.5 - Fjernede delnumre for TSO Comprehensive-analysemodul v2.3.3 - Opdateret terminologi i afsnittet Blindgrænse

Revidering	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200007789 v03	April 2022	• Tilføjede oplysninger om karakteristika af ydeevne relateret til NTRK-fusioner • Tilføjede mærkning KUN TIL EKSPORT • Opdaterede erklæring om tilsigtet brug for at tilføje NTRK1-3 CDx-kravet • Udvidede produktkomponentoplysninger til at omfatte softwarekomponent-delnumre
Dokumentnr. 200007789 v02	Februar 2022	• Korrigerede fejl i tabelhenvisning • Tilføjede begrænsning relateret til kimcellevariationer og somatiske variationer • Præciserede sprogbrug vedrørende detektering af genamplifikation
Dokumentnr. 200007789 v01	December 2021	• Opdaterede begrænsninger ved proceduren • Præciserede specifikationerne for den magnetiske holder og termocyklere på listen over udstyr og materialer
Dokumentnr. 200007789 v00	November 2021	Oprindelig udgivelse

Patenter og varemærker

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dennes datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående, skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder tilhørende nogen tredjeparter.

Anvisningerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at produktet/produkterne, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE ANVISNINGERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET/PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET/PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF PRODUKTET/PRODUKTERNE, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2025 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Produktmærkning

Du kan finde en fyldestgørende forklaring på de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen på support.illumina.com under fanen *Documentation* (Dokumentation) for det relevante sæt.