TruSight Oncology Comprehensive (EU)

illumina®

Packungsbeilage

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK. NUR FÜR DEN EXPORT.

Beabsichtigter Verwendungszweck

Der TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) ist ein *In-vitro-Diagnosetest,* der mithilfe von gezieltem Next-Generation Sequencing (NGS, Sequenzierung der nächsten Generation) Varianten in 517 Genen erfasst. Dazu werden Nukleinsäuren, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeproben (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin Embedded) von Krebspatienten mit soliden malignen Neoplasien extrahiert wurden, mithilfe des Illumina® NextSeq™ 550Dx-Geräts verarbeitet. Mit diesem Test werden Einzelnukleotid-Varianten, Mehrfachnukleotid-Varianten, Insertionen, Deletionen und Genamplifikationen aus DNA sowie Genfusionen und Spleißvarianten aus RNA erkannt. Der Test gibt außerdem einen Score für die Tumormutationslast (TMB) und den Status für die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) aus.

Der Test soll als Begleitdiagnostikverfahren Krebspatienten für die Behandlung mit der in Tabelle 1 aufgeführten gezielten Therapie identifizieren und entspricht der zugelassenen Kennzeichnung therapeutischer Produkte. Außerdem ist der Test darauf ausgerichtet, Informationen für das Tumor-Profiling bereitzustellen, die von medizinischem Fachpersonal gemäß den entsprechenden Richtlinien verwendet werden können. Er ist nicht als eindeutige oder präskriptive Diagnose für die vorgeschriebene Verwendung spezifischer therapeutischer Produkte gedacht.

Tabelle 1 Begleitdiagnostische Indikation

Tumortyp	Biomarker	Gezielte Therapie
Solide Tumoren	NTRK1-, NTRK2- und NTRK3-Genfusionen	VITRAKVI® (Larotrectinib)

Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

Klinische Beschreibung

Krebs ist eine der Haupttodesursachen weltweit und kann sich potenziell in jedem Gewebe entwickeln.[1, 2] Die Analyse der genetischen Basis einer Krebserkrankung ist entscheidend, um Patienten zu identifizieren, die von gezielten Therapien profitieren können, und um neue Behandlungsmethoden entwickeln zu können. Es werden zahlreiche Gene mit der Entstehung oder Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht. Viele Krebserkrankung wiederum können mit verschiedenen Varianten diese Gene und deren Funktionen beeinflussen. Zu diesen Varianten zählen Genmutationen wie beispielsweise Einzelnukleotid-Varianten (SNVs), Mehrfachnukleotid-Varianten (MNVs), Insertionen oder Deletionen, Genamplifikationen, Genfusionen und Spleißvarianten. Eine weitere Folge von durch Krebs hervorgerufenen Genmutationen ist das Vorhandensein

von Neoantigenen, die für die Krebserkrankung spezifische Immunreaktionen hervorrufen. Der Mutationsstatus einer Krebserkrankung kann durch die TMB und die MSI dargestellt werden. Diese genomischen Signaturen werden mit dem Vorhandensein von genomischer Instabilität und Krebs-Neoantigenen in Verbindung gebracht.

Bei TruSight Oncology Comprehensive handelt es sich um einen qualitativen Test mit Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) für das umfassende genomische Profiling (CGP), mit dem genomische Varianten in einem großen Panel krebsrelevanter Gene, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, allgemein untersucht werden. Der Assay erkennt kleine Varianten in 517 Genen sowie Genamplifikationen, Fusionen und Spleißvarianten, wie in Tabelle 2 angegeben. Der Assay bietet eine Coverage der codierenden Sequenz für alle Gene, mit Ausnahme von TERT, bei dem nur die Promotor-Region abgedeckt ist, und bestimmt den TMB-Score und den MSI-Status. Diese Assay-Targets beinhalten Regionen, die von Fachorganisationen sowie von anderen wichtigen US-Richtlinien zitiert werden. Publikationen unabhängiger Arbeitsgemeinschaften und marktnahe pharmazeutische Forschungen haben das Design des TSO Comprehensive-Assays ebenfalls beeinflusst.

Eine Liste der Regionen, die vom Varianten-Calling ausgeschlossen sind, finden Sie in der *TruSight Oncology Comprehensive Blockliste (Dokument Nr. 200009524)* auf der Illumina Support-Website.

In Tabelle 2 sind die folgenden Variantentypen aufgeführt: kleine DNA-Variante (S), Genamplifikation (A), Fusion (F) und Spleißvariante (Sp). Kleine DNA-Varianten umfassen SNVs, MNVs sowie Insertionen und Deletionen.

Tabelle 2 TSO Comprehensive (EU) Assay-Gen-Panel

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp
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	PDK1	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

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp
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
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

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp
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
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

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp
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
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

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variantentyp
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
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	ZFHX3	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	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.

Verfahrensprinzipien

Beim TSO Comprehensive (EU)-Assay handelt es sich um einen verteilten Test, der mit extrahierter Nukleinsäure als Zugabematerial manuell durchgeführt wird. Für die Bibliotheksvorbereitung wird aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe extrahierte DNA und/oder RNA verwendet. Die

Bibliotheken werden anschließend für- krebsrelevante Gene angereichert und mit dem NextSeq 550Dx-Gerät sequenziert.

Der TSO Comprehensive (EU)-Assay umfasst die folgenden Prozesse.

- **Vorbereitung und Anreicherung von Bibliotheken** – Für RNA werden insgesamt 40 ng RNA in komplementäre Doppelstrang-DNA (cDNA) umgewandelt. Für genomische DNA werden 40 ng genomischer DNA (gDNA) in kleine Fragmente geschnitten. An die cDNA- und gDNA-Fragmente werden Universaladapter für die Sequenzierung ligiert. In jede Bibliothek werden P5- und P7-Adaptersequenzen integriert, um während der Sequenzierung die Erfassung von Bibliotheksfragmenten an der Oberfläche der Fließzelle zu ermöglichen. Die Adapter enthalten eine i5- und i7-Indexsequenz zur Kennzeichnung der einzelnen Proben und, bei Bibliotheken aus gDNA-Proben, einzelner Moleküle unter Verwendung eindeutiger molekularer Identifikatoren (UMIs). Die Bibliotheken werden für die spezifischen Gene von Interesse mithilfe einer erfassungsbasierten Methode angereichert. Biotinylierte Sondensequenzen, die von dem Assay anvisierte Genregionen von Interesse umfassen, werden in die Bibliotheken hybridisiert. Die Sonden und hybridisierten Zielbibliotheken werden von den nicht anvisierten Bibliotheken durch Erfassung mit magnetischen Streptavidin-Partikeln isoliert. Die angereicherten Zielbibliotheken werden gewaschen und amplifiziert. Die Menge der einzelnen angereicherten Bibliotheken wird anschließend mit einer bead-basierten Methode normalisiert, um eine ausgewogene Bibliotheksrepräsentation in den gepoolten Bibliotheken für die Sequenzierung zu gewährleisten.
- **Sequenzierung und Primäranalyse** – Normalisierte, angereicherte Bibliotheken werden durch Pooling und Clustering einer Fließzelle hinzugefügt. Anschließend werden sie im NextSeq 550Dx mittels Sequenzierung durch Synthese (SBS) sequenziert. Die SBS-Chemie erkennt mithilfe einer Methode mit reversiblen Terminatoren einzelne mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Desoxynukleotid-Triphosphat-Basen (dNTP), die in wachsende DNA-Stränge eingebaut werden. Während jedes Sequenzierungszyklus wird ein einzelnes dNTP zur Nukleinsäurekette hinzugefügt. Die dNTP-Markierung dient als Terminator für die Polymerisation. Nach jeder dNTP-Integration wird der Fluoreszenzfarbstoff zur Identifizierung der Base abgebildet. Anschließend wird die Base gespalten, um die Integration des nächsten Nukleotids zu ermöglichen. Es sind vier an reversible Terminatoren gebundene dNTPs (A, G, T und C) als einzelne, separate Moleküle vorhanden. So werden Integrationsfehler durch natürliche Mechanismen minimiert. Während der Primäranalyse erfolgen Base-Calls bei jedem Sequenzierungszyklus direkt anhand von Signalstärkemessungen, sodass eine Base-für-Base-Sequenzierung erzielt wird. Jedem Base-Call wird ein Qualitäts-Score zugewiesen.
- **Sekundäranalyse** – Das Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module ist auf dem NextSeq 550Dx-Gerät installiert und Teil der Local Run Manager-Software. Es unterstützt die TSO Comprehensive (EU) Laufkonfiguration mit und führt die Sekundäranalyse der Sequenzierungsergebnisse durch. Die Sekundäranalyse umfasst die Validierung der Laufverarbeitung und die Qualitätskontrolle, gefolgt von Demultiplexing, Erstellen von FASTQ-Dateien, Alignment und Varianten-Calling. Durch Demultiplexing werden Daten aus zusammengefassten Bibliotheken anhand der eindeutigen Sequenzindizes, die während der Bibliotheksvorbereitung hinzugefügt wurden, getrennt. Es werden temporäre FASTQ-Dateien erstellt, die die Sequenzierungs-Reads für jede Probe und die Qualitäts-Scores ohne Reads von Clustern, die den Filter nicht passiert haben, enthalten. Anschließend werden die Sequenzierungs-Reads mit einem Referenzgenom aligniert, um eine Beziehung zwischen den Sequenzen

zu identifizieren. Anhand der Ähnlichkeitsregionen wird ein Score zugewiesen. Alignierte Reads werden in Dateien im BAM-Format gespeichert. Die Assay-Software verwendet für aus DNA- und/oder RNA-Proben generierte Bibliotheken separate Algorithmen: für das Calling kleiner DNA-Varianten, Genamplifikationen, TMB und MSI für DNA-Proben und das Calling von Fusionen und Spleißvarianten für RNA-Proben. Durch das Analysesoftwaremodul werden mehrere Ausgaben erstellt, einschließlich Sequenzierungsmetriken und VCF-Dateien Varianten-Call-Format VCF-Dateien enthalten Informationen über Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden. Für jede Probe werden Sequenzierungsmetriken und einzelne Ausgabedateien erstellt. Siehe *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)* für weitere Informationen zur Sekundär- und Tertiäranalyse.

- **Tertiäranalyse** – Die Tertiäranalyse des Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module umfasst TMB- und MSI-Berechnungen, Begleitdiagnostik-Calling, Tumor-Profiling von Varianten für zwei Stufen klinischer Signifikanz anhand einer Knowledge Base (KB) sowie des Gewebetyps und die Berichterstellung mit den Ergebnissen. Tumor-Profiling kann auch als umfassendes genomisches Profiling bezeichnet werden. Die interpretierten Variantenergebnisse und die Ergebnisse der TMB- und MSI-Biomarker werden im TSO Comprehensive (EU)-Ergebnisbericht zusammengefasst.

Einschränkungen des Verfahrens

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.

- Nur zur bestimmungsgemäßen Verwendung. Der Test muss unter Einhaltung der Vorschriften für klinische Labors durchgeführt werden.
- Die in Tabelle 2 zum Verwendungszweck aufgeführten genomischen Befunde sind hinsichtlich der Zulassung eines bestimmten therapeutischen Mittels weder präskriptiv noch abschließend.
- Für Varianten, die im TSO Comprehensive (EU)-Ergebnisbericht unter „Genomische Befunde mit nachgewiesener klinischer Signifikanz (Stufe 2)“ und „Genomische Befunde mit potenzieller klinischer Signifikanz (Stufe 3)“ aufgeführt sind, wurde keine klinische Validierung durchgeführt.
- Entscheidungen über die Versorgung und Behandlung von Patienten müssen auf dem unabhängigen medizinischen Urteil des behandelnden Arztes beruhen, wobei alle relevanten Informationen über den Zustand des Patienten, z. B. die Patienten- und Familienanamnese, körperliche Untersuchungen, Informationen aus anderen diagnostischen Tests und die Präferenzen des Patienten, in Übereinstimmung mit dem relevanten Versorgungsstandard zu berücksichtigen sind.
- Die Qualität von FFPE-Proben ist stark unterschiedlich. Bei Proben, die keinen standardmäßigen Fixierungsverfahren unterzogen wurden, lassen sich u. U. keine Nukleinsäuren extrahieren, die die Anforderungen der Qualitätskontrolle des Assays erfüllen (*Qualitätssicherung* auf Seite 86). Bei FFPE-Blöcken, die länger als fünf Jahre gelagert wurden, hat sich eine geringere Validität gezeigt.
- Die Leistung von TSO Comprehensive (EU) in Proben von Patienten, bei denen eine Organ-oder Gewebetransplantation erfolgt ist, wurde nicht untersucht.

- Ein hoher Anteil an nekrotischem Gewebe (≥ 23 %) kann die Eignung des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von Genamplifikationen und RNA-Fusionen beeinträchtigen.
- Somatische Treibermutationen können möglicherweise nicht zuverlässig nachgewiesen werden, wenn der Tumoranteil (nach Bereich) weniger als 20 % beträgt.
- Ein Ergebnis von Mikrosatelliteninstabilität (MS-Stabil) kann unzuverlässig sein, wenn der Tumoranteil weniger als 30 % beträgt. Ein Ergebnis von hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-Hoch) ist unabhängig vom Tumoranteil korrekt.
- Mit Gewebe assoziiertes Hämoglobin verringert die bestätigenden Reads für MET-Spleißvarianten.
- Bei stark rearrangierten Genomen mit Deletionen und Verlust der Heterozygotie stuft die TSO Comprehensive (EU)-Software DNA-Proben u. U. fälschlicherweise als kontaminiert ein (CONTAMINATION_SCORE > 3.106 und p-Wert > 0,049).
- Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein einer Mutation unterhalb der Nachweisgrenze (LOD) des Assays nicht aus.
- Die Sensitivität für den Nachweis kleiner DNA-Varianten kann durch folgende Faktoren beeinträchtigt werden:
  - Genomischer Kontext mit geringer Komplexität.
  - Erhöhung der Variantenlänge.
- Folgende Umstände können die Genauigkeit von TMB-Scores beeinträchtigen:
  - Tumoranteil, bei dem Keimbahn- und somatische Variantenallelfrequenzen (VAFs) konvergieren.
  - In öffentlichen Datenbanken unterrepräsentierte Populationen.
- Genamplifikationen sind die einzigen Kopienzahlvarianten, die von TSO Comprehensive (EU) berichtet werden. Gen-Deletionen werden vom Assay nicht berichtet.
- Fusions-Calling-Algorithmen in der TSO Comprehensive (EU)-Assay-Software berücksichtigen möglicherweise keine Evidenz aus Reads, die außerhalb der annotierten Gengrenzen liegen.
- Folgendes kann die Sensitivität für den Nachweis von Fusionen beeinträchtigen:
  - Geringe Komplexität der Bibliothek, die aufgrund von Abweichungen im Assay-Workflow (z. B. bei der Durchführung der Mischschritte unter *Denaturierung und Annealing der RNA* auf Seite 45) zu einer Verringerung der bestätigenden Reads führt.
  - Ein einzelnes Gen überspannt beide Bruchpunkte.
  - Mehrere Fusionsbruchpunkte mit einem oder mehreren Partnern liegen in unmittelbarer Nähe zueinander (In diesem Fall werden mehrere Bruchpunkte und Partner u. U. als ein einziger Bruchpunkt und Partner erfasst.).
  - Nach kleiner medianer Insert-Größe. Die mediane Insert-Größe muss bei mindestens 80 bp liegen, jedoch ist die Sensitivität im Bereich von 80–100 bp beeinträchtigt.
  - Geringe Komplexität der Sequenz oder homologer genomischer Kontext um Fusionsbruchpunkte.

- Fusionsbruchpunkte in Genomregionen mit überlappenden Genen können die Auflösung der an einer Fusion beteiligten Gene beeinträchtigen. Wenn sich mehrere Gene mit einem Bruchpunkt überlappen, werden im Assay alle Gene aufgeführt (durch Semikolons getrennt).
- Eine inkonsistente Coverage in der TERT-Promoter-Region kann dazu führen, dass aufgrund der geringen Tiefe kein Ergebnis ausgegeben wird.
- Fehler in der Annotation oder der KB können ein falsch positives oder falsch negatives Ergebnis zur Folge haben. Dazu gehört auch, dass Varianten falsch eingestuft werden (Genomische Befunde mit nachgewiesener klinischer Signifikanz [Stufe 2] oder Genomische Befunde mit potenzieller klinischer Signifikanz [Stufe 3]) oder die Annotationsinformationen im Bericht nicht korrekt sind. Annotations- oder KB-Fehler haben keinen Einfluss auf die in den CDx-Ergebnissen gemeldeten Varianten. Es gibt die folgenden drei möglichen Fehlerquellen:
  - TSO Comprehensive (EU) Variantenannotation. Anhand der Analyse von 2.448.350 Varianten aus COSMIC v92 wurde eine Fehlerquote von ca. 0,0027 % ermittelt. Die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers ist folglich gering.
  - Fehler in der KB, die durch den Kuratierungs-Prozess verursacht wurden.
  - Änderungen in der Relevanz von KB-Inhalten im Lauf der Zeit. Der Bericht entspricht dem Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Erstellung der KB-Version.
- TSO Comprehensive (EU) führt somatische Varianten in Berichten zu Varianten mit nachgewiesener klinischer Signifikanz oder Varianten mit potenzieller klinischer Signifikanz auf. Bei einem Tumor-Only-Test ist die Aufnahme von Keimbahn-Varianten (vererbt) in den Bericht möglich, jedoch nicht beabsichtigt. TSO Comprehensive (EU) nimmt Varianten anhand einer KB in den Bericht auf, ohne explizite Angabe, ob es sich um somatische oder Keimbahn-Varianten handelt.
- Die KB umfasst ausschließlich therapeutische, diagnostische und prognostische Assoziationen, die für die in einer nachgewiesenen soliden malignen Neoplasie vorhandenen Varianten relevant sind. Die Anfälligkeit oder das Krebsrisiko betreffende Assoziationen sind in der KB nicht enthalten.
- Die folgende Tabelle zeigt die Nukleotidänderungen für drei RET-Varianten, die der Assay nicht nachweisen kann. Andere Nukleotidänderungen für dieselbe Aminosäureänderung können nachgewiesen werden.

Tabelle 3 Nukleotidänderungen für drei RET-Varianten

Aminosäureänderung	Chr*	Position	Reference Allele (Referenz-Allel)	Alternative
p.E632_A640delinsVRP	Chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_C634delinsDVR	Chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_R635insPK	Chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = Chromosom

Produktkomponenten

Der TSO Comprehensive (EU)-Test umfasst folgende Komponenten:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) Kit (Illumina Katalog-Nr. 20063092) – Das Kit enthält Reagenzien mit ausreichendem Volumen für die Erstellung von 24 DNA- und 24 RNA-Bibliotheken. Dieses Volumen beinhaltet Patientenproben und Kontrollen. Kontrollen werden separat verkauf (siehe *Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien* auf Seite 18).
- Knowledge Base: Regelmäßig aktualisiert und im Illumina Lighthouse Portal zum Herunterladen verfügbar.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina Katalog-Nr. 20051843), der folgende Komponenten enthält:
  - TSO Comprehensive Schadenspakete
  - TSO Comprehensive Software Suite
  - TSO Comprehensive USB-Kit

Ein Illumina-Servicemitarbeiter installiert die jeweilige Version von TSO Comprehensive-Analysemodul (EU) auf dem Local Run Manager NextSeq 550Dx-Gerät. Ausführliche Informationen zum Analysemodul finden Sie in Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661).

Reagenzien

Bereitgestellte Reagenzien

Folgende Reagenzien werden mit dem TSO Comprehensive (EU)-Kit bereitgestellt.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, Artikel-Nr. 20031127

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Nukleotiden	-25 bis -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, DNA-Polymerase, RNase H und Nukleotiden	-25 bis -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Zufallshexameren	-25 bis -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit reverse transcriptase	-25 bis -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), Artikel-Nr. 20031118

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit T4-DNA-Polymerase und Polynukleotidkinase	-25 bis -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Nukleotiden	-25 bis -15 °C

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 bis -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Ligase	-25 bis -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit universellen Oligonukleotiden für die Sequenzierung	-25 bis -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit universellen Oligonukleotiden für die Sequenzierung	-25 bis -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 bis -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit DNA-Polymerase und Nukleotiden	-25 bis -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), Artikel-Nr. 20031119

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 bis 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Wässrige Lösung mit magnetischen Beads	2 bis 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris-EDTA-Lösung	2 bis 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, Artikel-Nr. 20031120

Wirkstoffe: gepufferte wässrige Lösung mit durch individuelle Barcodes gekennzeichneten Oligonukleotid-Primern.

⚠ VORSICHT

Verwenden Sie für RNA- oder DNA-Proben eindeutige Index-Primer (UPxx). CPxx- und UPxx-Index-Primer dürfen nicht in derselben Bibliothek kombiniert werden.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, Artikel-Nr. 20031126

Wirkstoffe: gepufferte wässrige Lösung mit durch individuelle Barcodes gekennzeichneten Oligonukleotid-Primern.

⚠ VORSICHT

Verwenden Sie kombinatorische Index-Primer (CPxx) nur für DNA-Proben. CPxx- und UPxx-Index-Primer dürfen nicht in derselben Bibliothek kombiniert werden.

Index-Primer	Artikelnummer	Menge	Volumen	i7-Index	Sequenz	i5-Index	Sequenz	Lagerungstemperatur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 bis -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 bis -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 bis -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 bis -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 bis -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 bis -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 bis -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 bis -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 bis -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 bis -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 bis -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 bis -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 bis -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 bis -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 bis -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 bis -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), Artikel-Nr. 20031123

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Formamid und Salzen	2 bis 8 °C

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und festphasigen paramagnetischen Beads, kovalent beschichtet mit Streptavidin	2 bis 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxidlösung	2 bis 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung	2 bis 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads	2 bis 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 bis 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 bis 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 bis 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Wässrige Lösung mit magnetischen Beads	2 bis 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), Artikel-Nr. 20031121

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Oligonukleotiden	-25 bis -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 bis -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel	-25 bis -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit DNA-Polymerase und Nukleotiden	-25 bis -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit P5- und P7-Primern	-25 bis -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2--Mercaptoethanol und Formamid	-25 bis -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 oder PhiX)	20031492	1	10 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit genomischer PhiX-DNA	-25 bis -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, Artikel-Nr. 20031122

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotid-Sondenpool	-25 bis -15 °C

Reagenz	Artikelnummer	Menge	Volumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotid-Sondenpool	-25 bis -15 °C

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

Voramplifikationsreagenzien

- DNA and RNA extraction and purification reagents – Die Anforderungen hinsichtlich der Reagenzien finden Sie unter *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28.
- DNA and RNA quantification reagents – Die Anforderungen hinsichtlich der Reagenzien finden Sie unter *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28.
- TruSight Oncology Kontrollproben:
  - TruSight Oncology DNA Control (Illumina Katalog-Nr. 20065041)
  - TruSight Oncology RNA Control (Illumina Katalog-Nr. 20065042)
- Ethanol (EtOH), 100 % (200 Proof), in Molekularbiologie-Qualität
- RNase-/DNase-freies Wasser

Nachamplifikationsreagenzien

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina Katalog-Nr. 20028871)
  - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
  - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- EtOH, 100 % (200 Proof), in Molekularbiologie-Qualität
- RNase-/DNase-freies Wasser

Lagerung und Handhabung von Reagenzien

Folgende Reagenzienkartons werden in gefrorenem Zustand geliefert. Lagern Sie diese bei -25 °C bis -15 °C.

Karton	Artikelnummer	Laborbereich
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Voramplifikation

Karton	Artikelnummer	Laborbereich
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Nachamplifikation
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Nachamplifikation

⚠ VORSICHT

Lagern Sie Reagenzien nicht in einem -frostfreien Tiefkühlgerät oder in einer Kühlschranktür.

Folgende Reagenzienkartons werden auf Gelkissen geliefert, um eine Temperatur zwischen 0 °C und 10 °C zu gewährleisten. Lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C.

Karton	Artikelnummer	Laborbereich
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Nachamplifikation

⚠ VORSICHT

Frieren Sie Reagenzien mit Beads (LNB1, SPB und SMB) nicht ein.

- Änderungen der physischen Struktur der Reagenzien können auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung).
- FSM, SSM, ERA1-B und TCB1 können produktbezogene Partikel enthalten. Beachten Sie die entsprechenden Richtlinien für die Handhabung der jeweiligen Reagenzien. Nach der Durchführung von FSM- und SSM-Mischschritten haben die verbleibenden weißen produktbezogenen Partikel keinen Einfluss auf die Leistung.
- Die Stabilität des TSO Comprehensive (EU)-Assays wurde überprüft. Die Leistung wurde für bis zu vier Verwendungen des Kits nachgewiesen. Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie bei den auf der Verpackung angegebenen Temperaturen gelagert werden.

Geräte und Materialien

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Geräte und Materialien für die Voramplifikation

Ausrüstung	Lieferant
Ultraschallgerät mit zugehörigem Zubehör Siehe *Konfigurationseinstellungen für das Ultraschallgerät zur DNA-Fragmentierung* auf Seite 23.	Allgemeiner Laborlieferant
Thermocycler mit den folgenden Spezifikationen: • Beheizter Deckel mit einer von 30 °C bis 100 °C einstellbaren Temperatur (oder Abschaltung der Heizung, wenn 30 °C nicht erzielt werden können) • Umfasst einen Temperaturbereich von 4 °C bis 99 °C • Temperaturgenauigkeit: ± 0,25 °C • Kompatibel mit 96-Well-PCR-Platten, 0,2 ml • Siehe *Thermocycler-Temperaturanstiegsrate* auf Seite 25	Allgemeiner Laborlieferant
Vortexer	Allgemeiner Laborlieferant
Mikroproben-Inkubatoren (2) mit Einsätzen für 96-Well-MIDI-Platten (2)	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifuge	Allgemeiner Laborlieferant
Plattenzentrifuge mit folgenden Spezifikationen: • Kompatibel mit 96-Well-Platten • Zentrifugieren mit 280 × g (+/- 10 %)	Allgemeiner Laborlieferant
Plattenschüttler mit folgenden Spezifikationen: • 2 mm Orbit • Schütteln mit 1.200 rpm und 1.800 rpm	Allgemeiner Laborlieferant
Siegelwalze oder Dichtkeil	Allgemeiner Laborlieferant
Magnetstativ mit folgenden Spezifikationen: • Ausgelegt für Präzipitation/Separation paramagnetischer Beads • Seitlich am Stativ angebrachte Magnete (nicht am Boden) • Kompatibel mit 96-Well-MIDI-Platten	Allgemeiner Laborlieferant

Ausrüstung	Lieferant
Präzisionspipetten, geeignet für die präzise Abgabe von Volumina zwischen 2 µl und 1000 µl mit den folgenden Spezifikationen: • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Abstufungen von 0,02 µl • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Abstufungen von 0,1 µl, 0,2 µl oder 0,5 µl • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Abstufungen von 1 µl oder 2 µl Pipetten müssen regelmäßig kalibriert werden und die Genauigkeit muss innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegen.	Allgemeiner Laborlieferant
Pipettierhilfe	Allgemeiner Laborlieferant
Eis oder Kälteblock	Allgemeiner Laborlieferant
Serologische 10-ml-Pipetten	Allgemeiner Laborlieferant
Selbsthaftende Verschlussfolie für 96-Well-Platten mit den folgenden Spezifikationen: • Abziehbar • Geeignet für PCR-Platten mit Rahmen oder Halbrahmen • Starker Klebstoff, der wiederholten Temperaturänderungen zwischen -20 °C und 100 °C widersteht. • DNase-/RNase-frei	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifugenröhrchen, mit einer Kapazität von 1,7 ml, nukleasefrei	Allgemeiner Laborlieferant
Nukleasefreie Reagenzienbehälter (Einwegwannen, 50 ml) (oder vergleichbar)	Allgemeiner Laborlieferant
Konische 15-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant
Konische 50-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant
Aerosol-resistente Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant
96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)	Fisher Scientific, Artikel-Nr. AB-0859 oder gleichwertig
96-Well-PCR-Platten, kompatibel mit Thermocycler, 0,2 ml (Polypropylen-Wells)	Allgemeiner Laborlieferant

Geräte und Materialien für die Nachamplifikation

Ausrüstung	Lieferant
NextSeq 550Dx Gerät	Illumina, Katalog-Nr. 20005715
Plattenzentrifuge mit folgenden Spezifikationen: • Kompatibel mit 96-Well-Platten • Zentrifugieren mit 280 × g (+/- 10 %)	Allgemeiner Laborlieferant

Ausrüstung	Lieferant
Thermocycler mit den folgenden Spezifikationen: • Beheizter Deckel (100 °C) • Umfasst einen Temperaturbereich von 4 °C bis 99 °C • Temperaturgenauigkeit: ± 0,25 °C • Kompatibel mit 96-Well-PCR-Platten, 0,2 ml • Siehe *Thermocycler-Temperaturanstiegsrate* auf Seite 25	Allgemeiner Laborlieferant
Vortexer	Allgemeiner Laborlieferant
Mikroproben-Inkubator mit Einsatz für 96-Well-MIDI-Platten	Allgemeiner Laborlieferant
Der Trockenhitzeblock muss folgende Spezifikationen erfüllen: • Temperaturbereich: 25 bis 99 °C • Temperaturgenauigkeit: ± 5 °C • Stellen Sie sicher, dass die Mikrozentrifugenröhrchen mit dem Hitzeblock kompatibel sind	Allgemeiner Laborlieferant
Plattenschüttler mit folgenden Spezifikationen: • 2 mm Orbit • Schütteln mit 1.200 rpm und 1.800 rpm	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifuge	Allgemeiner Laborlieferant
Siegelwalze oder Dichtkeil	Allgemeiner Laborlieferant
Magnetstativ mit folgenden Spezifikationen: • Ausgelegt für Präzipitation/Separation paramagnetischer Beads • Seitlich am Stativ angebrachte Magnete (nicht am Boden) • Kompatibel mit 96-Well-MIDI-Platten	Allgemeiner Laborlieferant
Präzisionspipetten, geeignet für die präzise Abgabe von Volumina zwischen 2 µl und 1000 µl mit den folgenden Spezifikationen: • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Abstufungen von 0,02 µl • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Abstufungen von 0,1 µl, 0,2 µl oder 0,5 µl • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Abstufungen von 1 µl oder 2 µl Pipetten müssen regelmäßig kalibriert werden und die Genauigkeit muss innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegen.	Allgemeiner Laborlieferant
Pipettierhilfe	Allgemeiner Laborlieferant
Serologische 10-ml-Pipetten	Allgemeiner Laborlieferant

Ausrüstung	Lieferant
Selbsthaftende Verschlussfolie für 96-Well-Platten mit den folgenden Spezifikationen: • Abziehbar • Geeignet für PCR-Platten mit Rahmen oder Halbrahmen • Starker Klebstoff, der wiederholten Temperaturänderungen zwischen -20 °C und 100 °C widersteht. • DNase-/RNase-frei	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifugenröhrchen, mit einer Kapazität von 2 ml, nukleasefrei	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifugenröhrchen, mit einer Kapazität von 1,7 ml, nukleasefrei	Allgemeiner Laborlieferant
Nukleasefreie Reagenzienbehälter (Einwegwannen, 50 ml) (oder vergleichbar)	Allgemeiner Laborlieferant
Konische 15-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant
Konische 50-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant
Aerosol-resistente Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant
96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)	Fisher Scientific, Artikel-Nr. AB-0859 oder gleichwertig
96-Well-PCR-Platten, kompatibel mit Thermocycler, 0,2 ml (Polypropylen-Wells)	Allgemeiner Laborlieferant
Eis oder Kälteblock	Allgemeiner Laborlieferant

Konfigurationseinstellungen für das Ultraschallgerät zur DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung bzw. Scherung von DNA beeinflusst die Assay-Leistung, da sie die Verteilung der Fragmentgröße bestimmt, die sich wiederum auf die Coverage der Sequenzierung auswirkt. Verschiedene Konfigurationen fokussierter Ultraschallbehandlung wurden evaluiert und für den TSO Comprehensive (EU)-Assay optimiert (Tabelle 4).

- Die Scherdauer wurde im Hinblick auf die Maximierung der in der *Qualitätssicherung* auf Seite 86 beschriebenen Metrik MEDIAN_EXON_COVERAGE angepasst. Die Scherdauer (siehe Tabelle 4) und die Ergebnisse für MEDIAN_INSERT_SIZE waren über die Konfigurationen hinweg unterschiedlich.
- Die Konfigurationen 1–4 und 6 wurden mit 8-Streifenröhrchen aus Glas getestet. Für Konfiguration 5 wurde ein einzelnes Glasröhrchen verwendet. Die Röhrchenvolumenkapazitäten sind in Tabelle 4 abgebildet.
- Bei der Optimierung der Konfigurationen 3–6 (kleinere Wasserbadvolumina) wurde die Pulszentrifugation verwendet.
- Die Konfigurationen 3–5 wurden in Röhrchen mit kleinerem Volumen geschert. Die Röhrchenvolumenkapazitäten beeinflussen die Scherparameter.

- Konfiguration 4 (Linearschallkopf, mittleres Wasserbadvolumen, entgastes Wasser) erforderte eine lange Impulsverzögerungszeit (40 Sekunden), um eine ähnliche MEDIAN_EXON_COVERAGE wie in Konfiguration 1 und 2 bei der nominalen Zugabe von 40 ng zu erzielen.
- Optimale Einstellungen für Konfiguration 3 führten zu einer etwas größeren Größenverteilung der Fragmente im Vergleich zu den anderen Konfigurationen (MEDIAN_INSERT_SIZE war etwa 5–10 Basenpaare größer).
- Die Konfigurationen 3 und 5 verwendeten nicht entgastes Wasser, die kleinsten Wasserbadgrößen.
- Die Konfigurationen 3 und 5 erforderten eine erhöhte DNA-Zugabe (50 ng für Konfiguration 3, 60 ng für Konfiguration 5), um eine ähnliche MEDIAN_EXON_COVERAGE im Vergleich zu den anderen 4 Konfigurationen zu erzielen, die die nominale Zugabe von 40 ng verwendeten.
- Bei Konfigurationen 3 und 5 kommt es zu einer stärkeren Schädigung und/oder Denaturierung. Dadurch ist die effektive Masse der für die Bibliotheksvorbereitung verwendbaren dsDNA-Moleküle geringer.

Zentrifugieren Sie die Scherröhrchen während des Rückgewinnungsprozesses, um sicherzustellen, dass das vorgegebene Volumen zurückgewonnen wird, da jeder Materialverlust die Leistung beeinträchtigt.

Tabelle 4 Ausgewertete Konfigurationen fokussierter Ultraschallbehandlung

Parameter	Konfiguration					
	1	2	3	4	5	6
Schallkopf	Linie	Punkt	Punkt	Linie	Punkt	Linie
Wasserbadvolumen	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Entgastes Wasser	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja
Wasserkühler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Wasserbadtemperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Spitzenimpulsleistung (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% Tastverhältnis	30	10	30	25	20	25
Zyklen pro Burst	200	200	1.000	1.000	1.000	600
Pulszentrifugation (Bursts von 10 Sekunden)	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Verzögerungszeit für Pulszentrifugation	N. z.	N. z.	10 s	40 s	10 s	10 s
Scherdauer	250 s	280 s	200 s[1]	320 s[2]	200 s[1]	320 s[2]
Probenverarbeitung	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Chargengröße	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Probenvolumen im 8-Streifen-Glasröhrchen	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Einzelröhrchen (50 µl)	130 µl (oder 96 microTUBE-Platte)
Dithering	N. z.	N. z.	N. z.	3 mm Y bei 20 mm/s	N. z.	1,5 mm Y bei 10 mm/s
DNA-Zugabeequivalent (für mittlere Exon-Coverage)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

[1] Die Scherdauer von 200 Sekunden umfasst 20 Bursts von je 10 Sekunden.
[2] Die Scherdauer von 320 Sekunden umfasst 32 Bursts von je 10 Sekunden.

Thermocycler-Temperaturanstiegsrate

Die Temperaturanstiegsrate des Thermocyclers wirkt sich auf die Assay-QC-Metriken (verwendbare MSI-Loci, mittlerer Klassenzählwert für das CNV-Ziel, mittlere Insert-Größe (RNA)) aus sowie auf die bestätigenden Reads für Spleißvarianten und Fusionen. Es wird empfohlen, die Thermocycler-Temperaturanstiegsrate zu

optimieren. Beispielsweise wurde ein getestetes Modell von einer Standard- (und einer maximalen) Temperaturanstiegsrate von 5 °C/s auf 3 °C/s angepasst, um vergleichbare Ergebnisse wie bei anderen Modellen mit niedrigeren Standard-Temperaturanstiegsraten zu erhalten.

Erfassen, Transportieren und Lagern von Proben

Befolgen Sie das Standardverfahren für das Erfassen, Transportieren, Lagern und Verarbeiten von Proben.

Probenanforderungen

FFPE-Gewebe

Für den TSO Comprehensive (EU)-Assay sind 40 ng RNA und/oder 40 ng DNA erforderlich, die aus FFPE-Gewebe extrahiert wurden. Durch Verwendung von sowohl RNA als auch DNA lassen sich alle angestrebten Variantentypen analysieren. Das Gewebe sollte mit für Molekularanalysen geeignetem Formalin-Fixativ (zum Beispiel 10 % neutral gepuffertem Formalin) fixiert werden. Das Gewebe darf nicht entkalkt sein. Vor Beginn des TSO Comprehensive (EU)-Assays muss die Gewebeprobe von einem Pathologen auf ihre Eignung für diesen Test untersucht werden. Zum Nachweis von somatischen Treibermutationen ist ein Tumoranteil von mindestens 20 % (Fläche) erforderlich. Der zuverlässige Nachweis des MSI-Status über eine Vielzahl von Proben hinweg erfordert einen Tumoranteil von mindestens 30 %. Wenn eine Probe mit einem Tumoranteil von weniger als 30 % getestet wird, um Ergebnisse mit anderen Variantentypen zu bestimmen, kann das stabile MSS-Ergebnis unzuverlässig sein. Ein MSI-Hoch-Ergebnis ist unabhängig vom Tumoranteil korrekt.

Der Tumoranteil für Genamplifikationen und RNA-Varianten ist abhängig vom Ausmaß der Amplifikation bzw. Fusionsexpression (siehe *Tumoranteil* auf Seite 112).

Für eine hohe Wahrscheinlichkeit der Extraktion von 40 ng RNA und 40 ng DNA aus verschiedenen festen Gewebetypen beträgt das empfohlene Gewebevolumen ≥ 1,0 mm^3. Dieses Volumen entspricht einer kumulativen lebensfähigen Gewebefläche von ≥ 200 mm^2 bei Verwendung von 5 µm dicken Schnitten oder ≥ 100 mm^2 bei Verwendung von 10 µm dicken Schnitten. Die kumulative Gewebefläche ergibt sich aus der Summe der verwendbaren Gewebeflächen in allen für die Extraktion eingereichten Abschnitten. Beispiel: Eine kumulative Gewebefläche von 200 mm^2 kann durch Extraktion von vier 5 µm dicken Abschnitten mit je 50 mm^2 Gewebefläche oder fünf 10 µm dicken Abschnitten mit je 20 mm^2 Gewebefläche erzielt werden. Durch Gewebsnekrose kann die Menge an gewonnenen Nukleinsäuren verringert werden. Die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse lässt sich minimieren, indem das Gewebe makroseziert wird, um den erwünschten verwendbaren Tumoranteil zu erzielen.

Ein hoher Anteil an nekrotischem Gewebe (≥ 23 %) kann die Eignung des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von Genamplifikationen und RNA-Fusionen beeinträchtigen. Enthalten die Probenschnitte mehr als 23 % nekrotisches Gewebe in der gesamten Gewebefläche, muss das nekrotische Gewebe durch eine Makrodisektion entfernt werden. Wenn das Labor RNA mit dem Assay analysiert, sollte Gewebe mit Hämoglobin vermieden oder minimiert werden, wenn Schnitte aus dem Gewebeblock entnommen werden. Siehe *Störende Substanzen* auf Seite 103.

FFPE-Gewebe auf Trägern kann bis zu 28 Tage lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren

- Extrahieren Sie mit im Handel erhältlichen Extraktionskits RNA und DNA aus FFPE-Gewebeproben. Unterschiede bei den Extraktionskits können sich auf die Leistung auswirken. Siehe *Bewertung des Kits zur Extraktion der Nukleinsäuren* auf Seite 101.
- Erhöhen Sie während der Extraktion nicht die Standardkonzentration von Proteinase K oder eines gleichwertigen Enzyms, die in einem Extraktionskit enthalten ist. Siehe *Störende Substanzen* auf Seite 103.
- Lagern Sie extrahierte Standard-Nukleinsäure gemäß den Anweisungen des Herstellers des Extraktionskits.
- Lagern Sie die extrahierte DNA bis zu 28 Tage bei -25 °C bis -15 °C.
- Lagern Sie die extrahierte RNA bis zu 28 Tage bei -85 °C bis -65 °C.
- Messen Sie DNA und RNA innerhalb von 28 Tagen nach Beginn der Bibliotheksvorbereitung, um Konzentrationsänderungen im Laufe der Zeit zu vermeiden. Quantifizieren Sie RNA und DNA mithilfe einer fluorometrischen Quantifizierungsmethode mit nukleinsäurebindenden Farbstoffen. Die Konzentration der Nukleinsäure sollte als Mittelwert von mindestens drei Messungen berechnet werden.
- Für den Assay sind 40 ng der einzelnen RNA-Proben, vorbereitet in RNase/DNase-free-water (nicht enthalten), mit einem Endvolumen von 8,5 µl (4,7 ng/µl) erforderlich.
- Für den Assay sind 40 ng der einzelnen gDNA-Proben mit einer minimalen Extraktionskonzentration von 3,33 ng/µl erforderlich. Für die Scherung ist ein Endvolumen von 52 µl (0,77 ng/µl) erforderlich, wobei mindestens 40 µl TEB (bereitgestellt) zur Verdünnung verwendet werden.

Bibliothekslagerung

Je nach Typ können Bibliotheken in Low-Bind-PCR-Platten 7 bis 32 Tage lang aufbewahrt werden (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Aufbewahrungsdauer für Bibliotheken

Bibliothekstyp	Platte	Anzahl der Tage	Lagerungstemperatur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 bis -15 °C
Fragmentierte gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 bis -15 °C
Vor der Anreicherung	ALS PCR	≤ 30	-25 bis -15 °C
Nach der Anreicherung	ELU2 PCR	≤ 7	-25 bis -15 °C
PCR, nach der Anreicherung	PL PCR	≤ 30	-25 bis -15 °C
Normalisiert	NL PCR	≤ 32	-25 bis -15 °C

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

⚠ WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gesundheitsschädliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Belüftung sollte für den Umgang mit gefährlichen Materialien in Reagenzien geeignet sein. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter support.illumina.com/sds.html.

- **Behandeln Sie alle Proben, als wären sie erwiesenermaßen infektiös.**
- **Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Benutzen Sie zum Pipettieren nicht den Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien Einweghandschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.**

Labor

- Vermeiden Sie Kontaminierungen, indem Sie im Labor einen unidirektionalen Workflow einhalten. Die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche müssen über eigene Geräte und Materialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexmischer und Zentrifuge) verfügen. Um eine Übertragung von Amplifikationsprodukten oder Sonden zu vermeiden, sollten Sie nach Betreten des Nachamplifikationsbereichs nicht mehr in den Voramplifikationsbereich zurückkehren.
- Führen Sie die Schritte zur Index PCR und Anreicherung in einem Nachamplifikationsbereich durch, um eine Übertragung von Amplifikationsprodukten zu vermeiden.
- Für die Bibliotheksvorbereitung ist eine RNase-/DNase-freie Umgebung erforderlich. Dekontaminieren Sie die Arbeitsbereiche sorgfältig mit RNase-/DNase-hemmendem Reinigungsmittel. Verwenden Sie Kunststoffe, die nachweislich frei von DNase, RNase und genomischer Human-DNA sind.
- Reinigen Sie für die Nachamplifikation die Arbeitsflächen und die Ausrüstung sorgfältig vor und nach jedem Verfahren mit einer frischen Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit (NaOCl). Die Lösung muss 10 Minuten lang auf den Oberflächen verbleiben. Wischen Sie die Oberflächen anschließend mit 70%igem Ethyl- oder Isopropylalkohol ab.
- Verwenden Sie nukleasefreie Mikrozentrifugenröhrchen, Platten, Pipettenspitzen und Behälter.

- Verwenden Sie für den gesamten Assay kalibrierte Ausrüstung. Die Ausrüstung muss für die in diesem Protokoll angegebenen Drehzahlen, Temperaturen und Volumen kalibriert werden.
- Die Verwendung von Präzisionspipetten gewährleistet eine genaue Reagenz- und Probenabgabe. Führen Sie die Kalibrierung regelmäßig gemäß den Herstellerspezifikationen durch.
- Beachten Sie bei Verwendung von Mehrkanalpipetten folgende Richtlinien:
  - Pipettieren Sie mindestens ein Volumen von ≥ 2 µl.
  - Spitzen mit Barriere müssen genau passen und für die Marke und das Modell der Mehrkanalpipette geeignet sein.
  - Bringen Sie die Spitzen mit einer Drehbewegung an, damit alle Spitzen ordnungsgemäß sitzen.
  - Aspirieren Sie bei einem Winkel von 90°, achten Sie auf gleiche Flüssigkeitsvolumen in allen Spitzen.
  - Mischen Sie alle Komponenten nach der Lieferung durch Auf- und Abpipettieren des Reaktionsgemisches.
  - Stellen Sie nach der Abgabe sicher, dass die Flüssigkeit vollständig aus jeder Spitze abgegeben wurde.
- Verwenden Sie für den Assay spezifizierte Ausrüstung und konfigurieren Sie die Programme gemäß den Anweisungen.
- Die Temperaturangaben für den Thermocycler und den Mikroproben-Inkubator beziehen sich auf die Reaktionstemperatur; diese kann von der für die Ausrüstung festgelegten Temperatur abweichen.

Assay

- Vermeiden Sie eine Kreuzkontaminierung.
  - Befolgen Sie im Umgang mit Proben und Reagenzien die Prinzipien zur guten Laborpraxis.
  - Verwenden Sie nach jeder Probe und nach der Abgabe von Reagenzien frische Verbrauchsmaterialien und frische Pipettenspitzen.
  - Verwenden Sie aerosolresistente Spitzen, um das Risiko einer Kreuzkontaminierung zu vermeiden.
  - Befolgen Sie beim Wechsel vom Voramplifikations- in den Nachamplifikationsbereich die Prinzipien eines unidirektionalen Workflows.
  - Verarbeiten und öffnen Sie jeweils immer nur einen Index-Primer. Schließen Sie jedes Index-Röhrchen unmittelbar nach der Verwendung. Im Kit finden Sie zusätzliche Verschlüsse.
  - Wechseln Sie Ihre Handschuhe häufig bzw. nach jeder Berührung mit Index-Primern oder Proben.
  - Entfernen Sie nicht verwendete Index-Primer-Röhrchen aus dem Arbeitsbereich.
  - Geben Sie Reagenzien, die in Röhrchenstreifen, Wannen oder Behältern verwendet wurden, nicht zurück in die Aufbewahrungsröhrchen.
  - Mischen Sie Proben mit einer Pipette und zentrifugieren Sie die Platte, wenn dies angegeben ist.
  - Verwenden Sie einen Mikroplattenschüttler. Mischen Sie die Platten nicht mit dem Vortexmischer.

- Tauschen Sie Assay-Komponenten aus unterschiedlichen Reagenzien-Kit-Chargen nicht gegeneinander aus. Die Charge des jeweiligen Reagenzien-Kits ist auf dem Etikett des Reagenzien-Kits und auf dem Übersichtsblatt zur Charge angegeben.
- Ordnungsgemäße Laborpraktiken sind unerlässlich, um eine Kontaminierung von Reagenzien, Instrumenten, Proben und Bibliotheken durch Nukleasen und PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontaminierung durch Nukleasen und PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- Nur mit dem entsprechenden Plattentyp können hinsichtlich Assay-Leistung und Lagerung optimale Ergebnisse erzielt werden. Die Anweisungen zur Plattenübertragung in der *Gebrauchsanweisung* auf Seite 40 sind unbedingt zu befolgen.
- Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Minderung der Bibliotheksqualität führen.
- Fahren Sie unmittelbar mit dem nächsten Schritt fort. Dies gilt nicht, wenn in der *Gebrauchsanweisung* auf Seite 40 ein sicherer Haltepunkt angegeben ist.
- Lagern Sie die Assay-Reagenzien oder Komponenten bei der angegebenen Temperatur in ausgewiesenen -Voramplifikations-- und Nachamplifikationsbereichen.
- Lagern Sie Reagenzien nicht in einem frostfreien Tiefkühlgerät oder in einer Kühlschranktür.
- Frieren Sie Reagenzien mit Beads (LNB1, SPB und SMB) nicht ein.
- Verwenden Sie ausschließlich Reagenzien, die ordnungsgemäß gelagert wurden.
- Halten Sie die Verfahren zum Mischen und zur Handhabung der jeweiligen Reagenzien genau ein. Ein unsachgemäßes Mischen oder übermäßiges Mischen von Reagenzien mit dem Vortexmischer kann zu fehlerhaften Probenergebnissen führen.
- FSM, SSM, ERA1-B und TCB1 können produktbezogene Partikel enthalten. Beachten Sie die Richtlinien für die Handhabung der jeweiligen Reagenzien. Nach der Durchführung von FSM- und SSM-Mischschritten haben die verbleibenden weißen produktbezogenen Partikel keinen Einfluss auf die Leistung.
- Bereiten Sie frische Master-Mischungen vor und entsorgen Sie die Restvolumen nach der Verwendung.
- Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol mit RNase-/DNase-freiem Wasser für die Schritte des Waschlaufs vor. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälschen kann. Entsorgen Sie das 80%ige Ethanol nach Gebrauch gemäß den örtlichen und/oder landesweiten Vorschriften.
- Übertragen Sie das angegebene Eluatvolumen. Wird während der Elutionsschritte ein geringeres als das angegebene Volumen an Eluat übertragen, kann dies die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Beachten Sie folgende Richtlinien für die Ultraschall-Sonicators. Halten Sie sich unbedingt an die Herstelleranweisungen.
  - Geben Sie die gDNA langsam in das Ultraschallröhrchen, um Blasenbildung zu vermeiden. Übermäßige Blasenbildung oder Lufteinschlüsse im Röhrchen führen möglicherweise zu einer unvollständigen Fragmentierung.
  - Befüllen Sie die Ultraschallröhrchen langsam und vermeiden Sie Spritzer.

  - Vermeiden Sie Flüssigkeitsverdrängung und Probenverluste, indem Sie beim Entfernen fragmentierter DNA mit der Pipettenspitze nicht den Boden des Ultraschallröhrchens berühren.
- Pipettieren Sie mindestens 2 µl der Probenzugabe.
- Verwenden Sie keine Schale zur Verteilung von Reagenzien für Schritte, bei denen weniger als 10 µl Material in die einzelnen Proben-Wells gegeben werden müssen.
- Übertragen Sie die Probe fragmentierter gDNA mithilfe einer Pipette mit feiner Spitze von den Ultraschallröhrchen auf die LP-Platte (Bibliotheksvorbereitung).
- Mischen Sie keinesfalls SUA1- und UMI-Adapter.
- Verwenden Sie SUA1-Adapter für RNA-Proben.
- Verwenden Sie UMI-Adapter für DNA-Proben.
- Weisen Sie jeder Bibliotheksprobe spezifische Index-Primer zu, um jede Bibliothek beim Pooling für die Sequenzierung auf eine einzelne Fließzelle eindeutig identifizieren zu können.
- CPxx- und UPxx-Index-Primer dürfen nicht in derselben Bibliothek kombiniert werden.
- Abweichungen zwischen den Proben und Index-Primern führen aufgrund der fehlenden eindeutigen Identifikation der Proben zu falschen Ergebnisberichten. Geben Sie die Proben-IDs ein und weisen Sie die Indizes in Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module zu, bevor Sie mit der Bibliotheksvorbereitung beginnen. Notieren Sie sich Proben-IDs, Indizierung und die Ausrichtung der Platten-Wells, damit diese Angaben während der Bibliotheksvorbereitung verfügbar sind.
- Verwenden Sie UPxx-Indizes für Bibliotheken, die aus RNA-Proben gewonnen wurden.
- Verwenden Sie UPxx-Indizes oder CPxx-Indizes für Bibliotheken, die aus DNA-Proben gewonnen wurden.
- Sequenzieren Sie pro Fließzelle maximal 8 RNA-Bibliotheken und 8 DNA-Bibliotheken. Sequenzieren Sie mindestens drei Bibliotheken. Befolgen Sie die Richtlinien unter *Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes* auf Seite 36.
- Fahren Sie nach dem Schritt „Binden“ in *Capture 1* auf Seite 64 und *Capture 2* auf Seite 68 unmittelbar mit dem Schritt „Waschlauf“ fort, um ein Trocknen der Bead-Pellets zu vermeiden.
- Entfernen Sie während der Waschlaufschritte das gesamte 80%ige Ethanol vom Boden der Wells. Restethanol hat nachweislich Auswirkungen auf die Ergebnisse.
- Stellen Sie eine optimale Assay-Leistung sicher, indem Sie die in der *Gebrauchsanweisung* auf Seite 40.
- Während des *Normalisieren der Bibliotheken* auf Seite 75 müssen Sie das Bibliotheks-Bead-Pellet sorgfältig resuspendieren, um auf der Fließzelle eine einheitliche Clusterdichte zu erzielen.
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Gerät unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedslandes, in dem sich Anwender und Patient befinden.

Verfahrenshinweise

- Der TSO Comprehensive (EU)-Workflow kann gemäß dem folgenden Plan durchgeführt werden:

  - 1. Tag: cDNA-Synthese aus RNA-Proben, DNA-Fragmentierung von gDNA-Proben, Bibliotheksvorbereitung und Beginn der (ersten) Hybridisierung über Nacht.
  - 2. Tag: Anreicherung, Normalisierung angereicherter Bibliotheken und Laden der Bibliotheken in das NextSeq 550Dx-Gerät.

  Für den Fall, dass der TSO Comprehensive (EU)-Workflow nicht gemäß diesem Plan durchgeführt werden kann, sind im Protokoll mehrere sichere Haltepunkte angegeben. Fahren Sie umgehend mit dem nächsten Schritt fort, außer wenn im Protokoll ein sicherer Haltepunkt angegeben ist.
- Aus RNA- und DNA-Proben gewonnene Bibliotheken können gleichzeitig in separaten Wells vorbereitet werden.
- In den Tabellen für die Vorbereitung der Master-Mischung sind Volumenüberschüsse angegeben, um sicherzustellen, dass ausreichend Volumen für die Anzahl zu verarbeitender Proben bereitsteht.
- Verwenden Sie Reinstwasser, das frei von Nukleasen ist.
- Spülen Sie nach Zugabe der Reagenzien die Spitze, indem Sie die Reagenzien im entsprechenden Well der Platte einmal aspirieren und wieder abgeben, sofern nicht anders im Verfahren angegeben.
- Die Raumtemperatur ist mit 15 °C bis 30 °C definiert.
- Reagenzien, Proben und/oder Bibliotheken müssen bei bestimmten Schritten der Gebrauchsanweisung gekühlt gelagert werden. Dies ist definiert als Aufbewahrung auf Eis oder gleichwertiger Aufbewahrung.

Programme des Thermocyclers

- Konfigurieren Sie vor Beginn des Protokolls die Programme des Thermocyclers an Geräten für die Vor- und Nachamplifikation.
- Stellen Sie sicher, dass die PCR-Platten fest im Thermocycler sitzen.
- Verwenden Sie vom Hersteller des Thermocyclers empfohlene Platten.

Versiegeln und Entsiegeln der Platte

- Versiegeln Sie die Platten mit einer neuen selbsthaftenden Verschlussfolie. Versiegelungen dürfen nicht mehrfach verwendet werden.
- Versiegeln Sie die Platte, in dem Sie die selbsthaftende Verschlussfolie mit einem Dichtkeil oder einer Siegelwalze auf der Platte anbringen.
- Versiegeln Sie die 96-Well-Platte stets vor den folgenden Schritten im Protokoll mit einer neuen selbsthaftenden Verschlussfolie:
  - Schritte zum Schütteln der Platte
  - Schritte zum Zentrifugieren
  - Thermocycler-Schritte
  - Hybridisierungen
  - Lagerung über einen längeren Zeitraum

- Stellen Sie sicher, dass die Ränder und Wells versiegelt sind, um das Risiko für Kreuzkontaminierung und Verdunstung zu verringern.
- Legen Sie die Platte auf eine ebene Oberfläche, bevor Sie die Versiegelung langsam entfernen.
- Wenn an der Versiegelung oder den Seitenwänden der Platten-Wells Flüssigkeit oder Kondensation sichtbar ist, zentrifugieren Sie die Platte vor Entfernen der Versiegelung 1 Minute lang bei 280 × g.
- Verwenden Sie selbsthaftende Verschlussfolie, die für Temperaturen zwischen -20 °C und 100 °C sowie für PCR-Platten mit Rahmen oder Halbrahmen geeignet ist.

Ausrüstung

- Stellen Sie vor Beginn des Assays sicher, dass die Labormitarbeiter mit den Herstelleranweisungen für Betrieb und Wartung sämtlicher Ausrüstung vertraut sind.

Plattentyp und Plattenübertragungen

- Nur mit dem entsprechenden Plattentyp können hinsichtlich Assay-Leistung und Lagerung optimale Ergebnisse erzielt werden.
- Wenn Sie Volumen zwischen den Platten übertragen, müssen die angegebenen Volumen aus jedem Well einer Platte in den entsprechenden Well der Zielplatte übertragen werden.
- Für das Übertragen von Proben zwischen Röhrchenstreifen oder Platten können Mehrkanalpipetten verwendet werden.
- Befolgen Sie beim Schütteln der Platten folgende Richtlinien.
  - Schütteln Sie Platten mit einem Plattenschüttler. Mischen Sie Platten nicht mit dem Vortexmischer.
  - Schütteln Sie PCR-Platten bei 1.200 rpm.
  - Schütteln Sie MIDI-Platten bei 1.800 rpm.
  - Befolgen Sie die Herstelleranweisungen, damit die Platte sicher im Plattenschüttler sitzt.

Zentrifugieren

- Wenn laut Protokoll ein kurzes Zentrifugieren erforderlich ist, zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 280 × g.
- Wenn an der Versiegelung oder den Seiten eines Wells Flüssigkeit sichtbar ist, zentrifugieren Sie die Platte 1 Minute lang bei 280 × g.

Handhabung von Reagenzien

- Verschließen Sie sorgfältig alle Reagenzienröhrchen unmittelbar nach Verwendung, um die Verdunstung zu minimieren und eine Kontaminierung zu verhindern.
- Lagern Sie die Reagenzien, die Sie für das Verfahren nicht mehr benötigen, wieder bei der angegebenen Aufbewahrungstemperatur.

- Befolgen Sie die Anweisungen für die Vorbereitung der Reagenzien, die vor der *Gebrauchsanweisung* auf Seite 40 angegeben sind.
- Stellen Sie sicher, dass Sie die für die Anzahl der zu verarbeitenden Proben erforderlichen Volumen der Master-Mischung, der Elutionsmischung und von 80%igem Ethanol bereitstellen.
- In den Tabellen für Master-Mischung und Lösungen sind die Volumen mit Überschüssen angegeben. Die Überschüsse werden wie folgt berechnet.
  - Tabelle 14
    - Volumen FSM = (7,2 µl) x (Anzahl der Proben + Kontrollproben) x (1,25)
    - Volumen RVT = (0,8 µl) x (Anzahl der Proben + Kontrollproben) x (1,25)
  - Tabelle 21
    - Volumen ERA1-B = (7,2 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,20)
    - Volumen ERA1-A = (2,8 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,20)
  - Tabelle 29
    - Volumen EE2 = (20,9 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,364)
    - Volumen HP3 = (1,1 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,364)
  - Tabelle 30
    - Volumen EE2 = (20,9 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,364)
    - Volumen HP3 = (1,1 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,364)
  - Tabelle 36
    - Volumen LNA1 = (38,1 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (2,0)
    - Volumen LNB1 = (6,9 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (2,0)
  - Tabelle 37
    - Volumen EE2 = (30,4 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,25)
    - Volumen HP3 = (1,6 µl) x (Anzahl der Bibliotheken) x (1,25)

Adaptersätze

- Der TSO Comprehensive (EU)-Assay beinhaltet SUA1- und UMI-Adapter.
- SUA1-Adapter sind zur Verwendung mit RNA-Proben bestimmt. Verwenden Sie sie nicht mit DNA-Proben.
- UMI-Adapter sind zur Verwendung mit DNA-Proben bestimmt. Verwenden Sie sie nicht mit RNA-Proben.

Handhabung von Beads

- Der TSO Comprehensive (EU)-Assay umfasst drei Bead-Typen (SPB, SMB und LNB1). Stellen Sie sicher, dass für das Verfahren der richtige Bead-Typ verwendet wird.
- Führen Sie für jeden Bead-Typ die korrekte Anzahl an Waschläufen durch.
- Die Beads müssen vor der Verwendung Raumtemperatur erreicht haben.

- Mischen Sie die Beads vor der Verwendung 1 Minute lang, um Homogenität zu gewährleisten.
- Beachten Sie beim Mischen von Beads mit einer Pipette die folgenden Richtlinien:
  - Verwenden Sie stets eine Pipetten- und Spitzengröße, die dem zu mischenden Volumen entspricht.
  - Stellen Sie das Pipettenvolumen auf rund 50 bis 75 % des Probenvolumens ein.
  - Pipettieren Sie langsam, lassen Sie den Kolben nicht los.
  - Vermeiden Sie Spritzen und Blasenbildung.
  - Positionieren Sie die Pipettenspitze über dem Pellet und pipettieren Sie direkt in das Pellet, um Beads vom Well oder Röhrchen zu lösen.
  - Das Bead-Pellet muss sich vollständig in der Lösung befinden. Die Lösung muss eine dunkelbraune Farbe und eine homogene Konsistenz aufweisen.
  - Überprüfen Sie, ob ein Bead-Pellet vorhanden ist. Aspirieren Sie vorsichtig die gesamte Bead-Lösung des Wells in die Spitze und inspizieren Sie den Well-Boden.
- Wenn die Beads während der magnetischen Trennung in die Pipettenspitzen aspiriert werden, geben Sie die Beads in den Platten-Well auf dem Magnetstativ zurück. Warten Sie ca. 2 Minuten, bis die Flüssigkeit klar ist, bevor Sie mit dem nächsten Schritt des Verfahrens fortfahren.
- Bei Waschläufen für Beads:
  - Verwenden Sie für die Platte das empfohlene Magnetstativ.
  - Geben Sie Flüssigkeit direkt auf das Bead-Pellet, sodass Beads an den Seiten der Wells befeuchtet sind.
  - Entfernen Sie die Platte erst vom Magnetstativ, wenn dies im Verfahren angegeben ist.
  - Vermeiden Sie eine Berührung der Platte, wenn sich diese auf dem Magnetstativ befindet.
  - Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets, wenn sich die Platte auf dem Magnetstativ befindet.
- Führen Sie beim Waschen der Beads oder Entfernen von Überständen die Pipettenspitzen in einem Winkel an den Boden des Wells, um das Entstehen eines Vakuums und das Aufziehen der Lösung in die Filterspitzen der Pipette zu vermeiden.

Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes

Legen Sie vor der Laufkonfiguration die Anzahl der Probenbibliotheken und Probenindizes für den Sequenzierungslauf fest. Die folgenden Richtlinien für die Probenanzahl beinhalten positive Kontrollproben, jedoch keine negativen Kontrollproben oder Kontrollproben ohne Matrize (NTCs). NTCs müssen dem geplanten Lauf als zusätzliche Probe hinzugefügt werden.

Für TSO Comprehensive (EU) beachten Sie die Richtlinien in Tabelle 6 und Tabelle 7, um die Anzahl der zu sequenzierenden RNA- bzw. DNA-Bibliotheken auf einer Fließzelle zu ermitteln. Siehe Tabelle 6 wenn Sie RNA- *oder* DNA-Bibliotheken separat sequenzieren. Siehe Tabelle 7, wenn Sie *RNA- und* DNA-Bibliotheken auf derselben Durchflusszelle sequenzieren.

Tabelle 6 Sequenzierung von RNA- *oder* DNA-Bibliotheken

Bibliothekstyp	Mindestens*	Höchstens*
Nur RNA	3	16
Nur DNA	3	8

* NTCs tragen nicht zur Plexität bei.

Tabelle 7 Sequenzierung von RNA- *und* DNA-Bibliotheken auf derselben Durchflusszelle

Bibliothekstyp	Mindestens*	Höchstens*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTCs tragen nicht zur Plexität bei.

Für eine optimale Nutzung der Reagenzien bei der Sequenzierung von DNA- *und* RNA-Bibliotheken mit TSO Comprehensive (EU) auf dem NextSeq 550Dx-Gerät, sollten Sie 8 RNA-Bibliotheken und 8 DNA-Bibliotheken pro Fließzelle sequenzieren.

Index-Primer ermöglichen das eindeutige Identifizieren jeder Probe. Bibliotheken können so für die Sequenzierung auf einer Fließzelle gepoolt werden. Kompatible Indexkombinationen werden während der Laufkonfiguration im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) im Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module angezeigt. Fügen Sie während der Bibliotheksvorbereitung jeder Probenbibliothek den Index-Primer hinzu. *Verwenden Sie für jede Probenbibliothek eine andere Index-Primer-Mischung.*

Die von Ihnen mit Proben verwendeten Index-Primer müssen den von Ihnen in Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module zur Analyse ausgewählten Indizes entsprechen. *Abweichungen führen aufgrund der fehlenden positiven Probenidentifizierung zu falschen Ergebnisberichten.*

Das TSO Comprehensive (EU)-Assay umfasst zwei Indextypen.

- **UPxx-Indizes:** Verwenden Sie UPxx-Indizes für Bibliotheken, die aus RNA- oder DNA-Proben gewonnen wurden.
- **CPxx-Indizes:** Verwenden Sie CPxx-Indizes für Bibliotheken, die aus DNA-Proben gewonnen wurden. CPxx-Indizes dürfen nicht für aus RNA gewonnene Bibliotheken oder bei der Sequenzierung von nur drei DNA-Bibliotheken verwendet werden.

Werden nur drei Bibliotheken sequenziert, ist Folgendes zu beachten:

- Die Bibliotheken müssen ausschließlich aus DNA oder ausschließlich aus RNA bestehen.
- Es dürfen keine CPxx-Indexsätze verwendet werden.
- Durch einen der folgenden UPxx-Indexsätze muss eine ausreichende Vielfalt gewährleistet werden:
  - UP01, UP02 und UP03
  - UP04, UP05 und UP06
  - UP07, UP08 und UP09
  - UP10, UP11 und UP12

  Beispiel: Der ersten Bibliothek wird UP01, der zweiten UP02 und der dritten UP03 zugewiesen.

TruSight Oncology Kontrollproben

TSO Comprehensive (EU) erfordert TruSight Oncology Controls, die aus der TruSight Oncology DNA-Kontrolle und der TruSight Oncology RNA-Kontrolle als Positivkontrollen bestehen. Geben Sie bei der Bibliotheksvorbereitung TruSight Oncology DNA Control für alle DNA-Sequenzierungsläufe und TruSight Oncology RNA Control für alle RNA-Sequenzierungsläufe hinzu. (Fügen Sie außerdem Kontrollproben für kombinierte DNA- und RNA-Läufe hinzu.) Für jeden geplanten Sequenzierungslauf wird eine eindeutige positive Kontrollprobe vorbereitet. Siehe TruSight Oncology Controls Packungsbeilage (Dokument-Nr. 200009919) für weitere Informationen.

Die Eingangsmenge der Positivkontrolle beträgt 40 ng für DNA und RNA.

Fügen Sie bei jeder Vorbereitung einer RNA- und DNA-Bibliothek eine entsprechende NTC hinzu. Die NTC wird innerhalb einer Bibliotheksvorbereitung wiederholt sequenziert. Befolgen Sie diese Anweisungen für die TruSight Oncology Controls:

- Bereiten Sie Bibliotheken aus positiven Kontrollproben und negative Kontrollproben auf die gleiche Weise wie Proben vor.
- Verwenden Sie TEB für die DNA NTC.
- Verwenden Sie für die RNA NTC DNase-/RNase-freies Wasser.
- Die positiven Kontrollproben sind in den Maximalanforderungen für Bibliotheken enthalten.
- Die NTCs sind nicht in den Mindestanforderungen für Bibliotheken enthalten.
- Verwenden Sie bei der Sequenzierung von UP-Indizes für die NTC nur 3 Bibliotheken.
- Da die NTC wiederholt sequenziert wird, können die für diese Kontrollprobe ausgewählten Indizes für die Bibliotheksvorbereitung nicht erneut verwendet werden.

In den folgenden Tabellen sind Beispiele für Plattenlayouts für die Bibliotheksvorbereitung aufgeführt. In jeder nummerierten Spalte ist ein einzelner Sequenzierungslauf dargestellt. Werden DNA- und RNA-Bibliotheken gemeinsam sequenziert, stellen die entsprechenden Spaltensätze jeweils einen einzelnen Sequenzierungslauf dar (zum Beispiel Spalte 1 und Spalte 7). Die NTC wird für jede Spalte bzw. jeden Spaltensatz sequenziert.

Tabelle 8 Bibliotheksvorbereitung für einen Einzellauf mit sechs Patientenproben

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos. DNA-Kontrolle	leer	leer	leer	leer	leer	Pos. RNA-Kontrolle
B	DNA 1	leer	leer	leer	leer	leer	RNA 1
C	DNA 2	leer	leer	leer	leer	leer	RNA 2
D	DNA 3	leer	leer	leer	leer	leer	RNA 3
E	DNA 4	leer	leer	leer	leer	leer	RNA 4
F	DNA 5	leer	leer	leer	leer	leer	RNA 5
G	DNA 6	leer	leer	leer	leer	leer	RNA 6
H	DNA NTC	leer	leer	leer	leer	leer	RNA NTC

Tabelle 9 Bibliotheksvorbereitung mit drei Läufen mit 20 Patientenproben

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

Gebrauchsanweisung

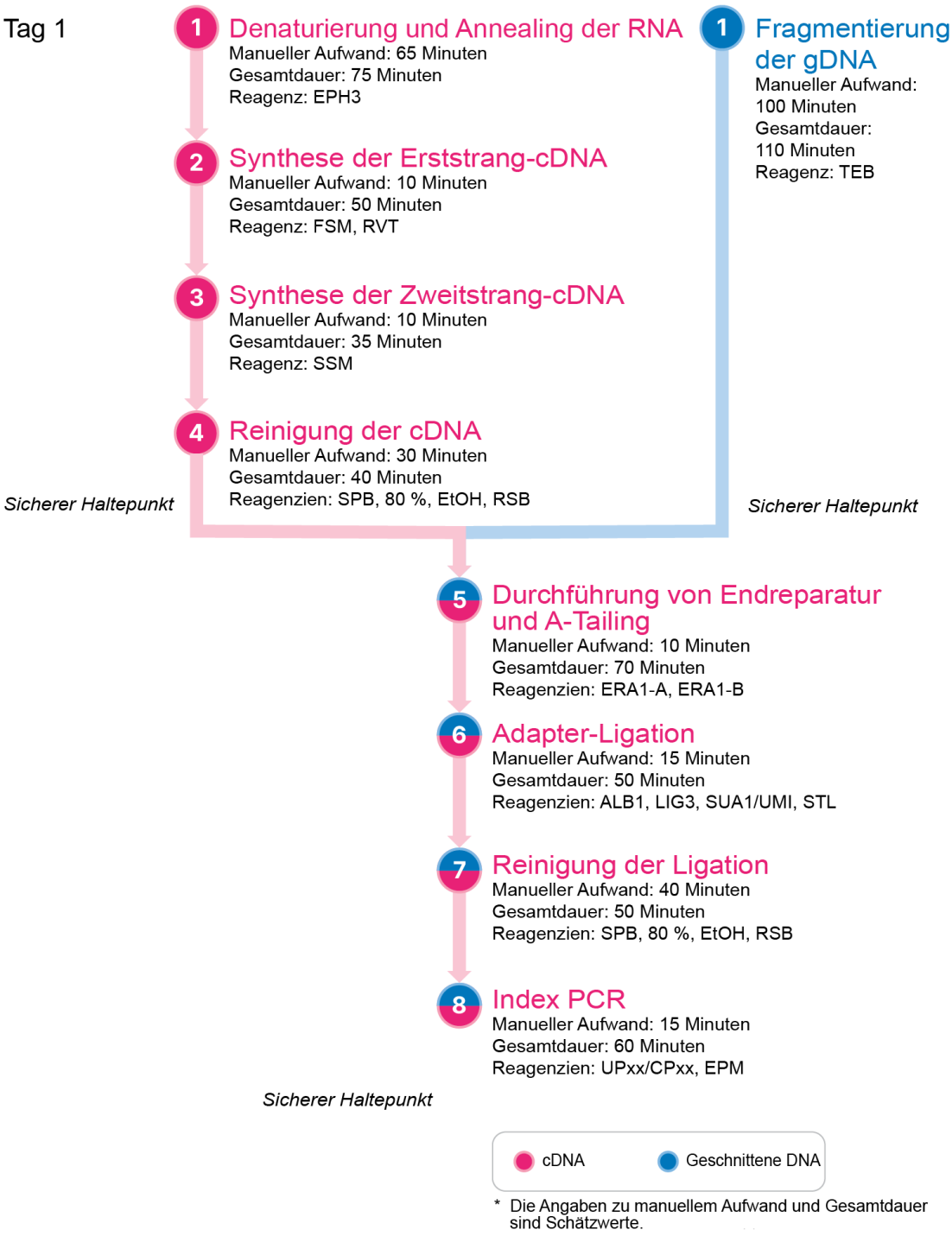
Abbildung 1 und Abbildung 2 bieten einen Überblick über den TSO Comprehensive (EU)-Workflow.

Bibliotheksvorbereitungs-Workflow

Abbildung 1 ist der Bibliotheksvorbereitungs-Workflow für TSO Comprehensive (EU) dargestellt. Bibliotheken aus RNA- und DNA-Proben können gleichzeitig in separaten Wells vorbereitet werden. Positive Kontrollproben und negative Kontrollproben werden auf die gleiche Weise wie Proben verarbeitet. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Geben Sie vor dem Starten des Protokolls die Lauf- und Probeninformationen in das Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module ein. Weitere Informationen finden Sie im *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)*.

Abbildung 1 TSO Comprehensive (EU) Workflow (Teil 1)



* Die Angaben zu manuellem Aufwand und Gesamtdauer sind Schätzwerte.

Anreicherungs-Workflow

Abbildung 2 ist der Anreicherungs-Workflow für TSO Comprehensive (EU) dargestellt. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Abbildung 2 TSO Comprehensive (EU) Workflow (Teil 2)

Programmieren des Thermocyclers

Speichern Sie vor Beginn des Assays die folgenden Programme auf Thermocyclern für die Vor- und Nachamplifikation.

Tabelle 10 Thermocycler-Programme für die Voramplifikation

Verfahrensschritt	Programm-name	Deckel-temperatur	Reaktions-volumen	Thermocycler-Parameter
Denaturierung und Annealing der RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C für 5 Minuten • 4 °C für 1 Minute • Bei 4 °C halten
Synthese der Erststrang-cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C für 10 Minuten • 42 °C für 15 Minuten • 70 °C für 15 Minuten • 4 °C für 1 Minute • Bei 4 °C halten
Synthese der Zweitstrang-cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C für 25 Minuten • 4 °C für 1 Minute • Bei 4 °C halten

HINWEIS Wenn die Deckeltemperatur für 2ndSS nicht auf 30 °C festgelegt werden kann, müssen Sie die Option für das Vorheizen des Deckels deaktivieren.

Tabelle 11 Thermocycler-Programme für die Nachamplifikation

Verfahrensschritt	Programmname	Deckeltemperatur	Reaktionsvolumen	Thermocycler-Parameter

Index PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C für 30 Sekunden
				• 15 Zyklen mit folgenden Parametern:
				  • 98 °C für 10 Sekunden
				  • 60 °C für 30 Sekunden
				  • 72 °C für 30 Sekunden
				• 72 °C für 5 Minuten
				• Bei 10 °C halten

Verfahrensschritt	Programmname	Deckeltemperatur	Reaktionsvolumen	Thermocycler-Parameter
Durchführung der ersten Hybridisierung	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C für 10 Minuten • 85 °C für 2 Minuten 30 Sekunden • 75 °C für 2 Minuten 30 Sekunden • 65 °C für 2 Minuten 30 Sekunden • Aufbewahrung bei 57 °C für 8 bis 24 Stunden
Durchführung der zweiten Hybridisierung	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C für 10 Minuten • 85 °C für 2 Minuten 30 Sekunden • 75 °C für 2 Minuten 30 Sekunden • 65 °C für 2 Minuten 30 Sekunden • Aufbewahrung bei 57 °C für 1,5 bis 4 Stunden

Amplifikation der angereicherten Bibliothek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C für 30 Sekunden
				• 18 Zyklen mit folgenden Parametern:
				  • 98 °C für 10 Sekunden
				  • 60 °C für 30 Sekunden
				  • 72 °C für 30 Sekunden
				• 72 °C für 5 Minuten
				• Bei 10 °C halten

Vorbereiten für Protokoll

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

⚠ VORSICHT

Für alle Verfahren des Workflows ist eine RNase-/DNase-freie Umgebung erforderlich.

1. Dekontaminieren Sie die Arbeitsbereiche sorgfältig mit RNase-/DNase-hemmendem Reinigungsmittel.
2. Vergewissern Sie sich, dass die Programme des Thermocyclers für die Voramplifikation konfiguriert sind. Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
3. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers zur Einrichtung des Ultraschall-Sonicators.
4. Wenn Sie nur DNA-Proben verarbeiten, fahren Sie direkt mit *Fragmentierung der gDNA* auf Seite 51 fort.
5. Entnehmen Sie die RNA-Kontrollproben aus dem Lagerort.
6. Entnehmen Sie die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (Artikel-Nr. 20031127)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
EPH3	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Denaturierung und Annealing der RNA
FSM	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Synthese der Erststrang-cDNA
RVT	-25 bis -15 °C	Kühl lagern.	Synthese der Erststrang-cDNA
SSM	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Synthese der Zweitstrang-cDNA

Tabelle 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (Artikel-Nr. 20031119)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
SPB (hellgrünes Etikett)	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Reinigung der cDNA
RSB	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Reinigung der cDNA

Denaturierung und Annealing der RNA

Mit diesem Prozess wird gereinigte RNA denaturiert und mit Zufallshexameren aufgefüllt, um die cDNA-Synthese vorzubereiten.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:

- EPH3: Halten Sie das Reagenz bereit.
- FSM: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer. Zentrifugieren Sie kurz und pipettieren Sie zum Mischen.
  Das Reagenz könnte weiße produktbezogene Partikel enthalten. Es ist keine Benutzeraktion erforderlich. Es gibt keine Auswirkungen auf die Produktleistung.
- RVT: Zentrifugieren Sie kurz und pipettieren Sie zum Mischen. Kühl lagern.

HINWEIS RVT ist eine viskose Lösung. Minimieren Sie die Blasenbildung während des Pipettierens.

2. Mischen Sie die folgenden Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um eine FSM + RVT-Master-Mischung vorzubereiten.

Tabelle 14 FSM + RVT-Master-Mischung

Komponente Master-Mischung	4 Biblio-theken (µl)	8 Biblio-theken (µl)	16 Biblio-theken (µl)	24 Biblio-theken (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Siehe *Handhabung von Reagenzien* auf Seite 34 für Berechnungen.

3. Pipettieren Sie zum Mischen zehnmal.
4. Lagern Sie die FSM + RVT-Master-Mischung gekühlt, bis Sie den Prozess *Synthese der Erststrang-cDNA* auf Seite 47 beginnen.

Verfahren

1. Die extrahierten RNA-Proben und RNA-Kontrollen während des Auftauens gekühlt lagern.
   Prozessieren Sie im restlichen Verlauf des Protokolls RNA-Kontrollproben als Proben.
2. Lagern Sie die RNA bei Nichtgebrauch gekühlt. Informationen zur Quantifizierung der Proben finden Sie unter *Probenanforderungen* auf Seite 27.
3. Pipettieren Sie jede RNA-Probe zehnmal, um sie zu mischen.
4. Bereiten Sie mithilfe von RNase-/DNase-freiem Wasser 40 ng jeder RNA-Probe in einem Endvolumen von 8,5 µl (4,7 ng/µl) vor.
   Beachten Sie bei RNA-Kontrollproben die auf dem Röhrchenetikett angegebene Konzentration.
5. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „CF“ (cDNA-Fragmente).
6. Geben Sie 8,5 µl jeder RNA-Probe in einen eindeutigen Well der CF PCR-Platte.
7. Stellen Sie sicher, dass das Layout der Probenplatte und die Indizes der einzelnen Proben dem während der Laufkonfiguration in TSO Comprehensive-Analysemodul (EU) geplanten Lauf entsprechen.
8. Mischen Sie EPH3 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
9. Fügen Sie jedem Proben-Well 8,5 µl EPH3 hinzu.

10. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CF PCR-Platte an.

    ⚠ VORSICHT

    Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.

11. Schütteln Sie 1 Minute lang bei 1.200 rpm.
12. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 280 × g.
13. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm „LQ-RNA“ aus.
    Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
14. Wenn die Proben 4 °C erreichen, Temperatur 1 Minute lang halten. Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort.

Synthese der Erststrang-cDNA

In diesem Prozess werden die mit Zufallshexameren vorgefüllten RNA-Fragmente mithilfe von reverser Transkriptase in Erststrang-cDNA reverse transcriptase.

Verfahren

1. Entnehmen Sie die CF PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Pipettieren Sie die FSM + RVT-Master-Mischung zehnmal, um diese zu mischen. Stellen Sie sicher, dass die FSM + RVT-Mischung vollständig homogen ist.
3. Geben Sie in jeden Proben-Well 8 µl FSM + RVT-Master-Mischung.
4. Pipettieren Sie zum Mischen zehnmal.
5. Entsorgen Sie die restliche FSM + RVT-Master-Mischung.
6. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CF PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
7. Schütteln Sie 1 Minute lang bei 1.200 rpm.
8. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 280 × g.
9. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm „1stSS“ aus.
   Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
10. Wenn die Proben eine Temperatur von 4 °C erreicht haben, müssen Sie unmittelbar mit dem nächsten Schritt fortfahren.
    Erststrangproben können 5 Minuten lang bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt werden.

Synthese der Zweitstrang-cDNA

In diesem Prozess wird die RNA-Matrize entfernt und doppelsträngige cDNA synthetisiert.

Vorbereitung

1. Vorbereiten von SSM:
   a. Invertieren Sie die Lösung zum Mischen 10 Mal.
   b. Zentrifugieren Sie kurz. Das Reagenz könnte weiße produktbezogene Partikel enthalten. Es ist keine Aktion erforderlich. Es gibt keine Auswirkungen auf die Produktleistung.

Verfahren

1. Entnehmen Sie die CF PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Fügen Sie jedem Proben-Well 25 µl SSM hinzu.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CF PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
4. Schütteln Sie 1 Minute lang bei 1.200 rpm.
5. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 280 × g.
6. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm „2ndSS“ aus.
   Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
7. Wenn die Proben eine Temperatur von 4 °C erreicht haben, müssen Sie 1 Minute warten und dann unmittelbar mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Reinigung der cDNA

Während dieses Prozesses wird die cDNA mithilfe von SPB von unerwünschten Reaktionskomponenten gereinigt. Die Beads durchlaufen zwei Waschläufe mit frischem 80%igem EtOH. Die cDNA wird mit RSB eluiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - SPB: Lagern Sie die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
   - RSB: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
2. Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol in einem konischen Röhrchen mit 15 ml oder 50 ml Fassungsvermögen wie folgt vor.

   Tabelle 15 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol zu

Reagenz	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken
100%iges EtOH, rein	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase-/DNase-freies Wasser	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Mischen Sie frisches 80%iges Ethanol mit dem Vortexmischer.

4. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „BIND1“ (cDNA-Bindung).
5. Decken Sie sie ab und halten Sie sie bereit.
6. Stellen Sie den Magneten bereit.

Verfahren

Binden

1. Entnehmen Sie die CF PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Mischen Sie SPB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
3. Fügen Sie jedem Proben-Well der BIND1 MIDI-Platte unmittelbar 90 µl SPB hinzu.
   Wenn SPB aus einer Schale verteilt wird, muss bei der Bestimmung des für die einzelnen Proben erforderlichen Materials ein Überschussfaktor von 1,15 einberechnet werden. Entsorgen Sie das übrige Material, nachdem SPB in alle Proben-Wells gegeben wurde.
4. Übertragen Sie das gesamte Volumen (50 µl) jeder Probe von der CF PCR-Platte in den entsprechenden Well der BIND1 MIDI-Platte.
5. Entsorgen Sie die leere CF PCR-Platte.
6. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BIND1 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
7. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
8. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
9. Platzieren Sie die BIND1 MIDI-Platte 5 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
10. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

Waschlauf

1. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
   a. Platzieren Sie die BIND1 MIDI-Platte auf dem Magnetstativ und fügen Sie jedem Well 200 µl frisches 80%iges Ethanol hinzu.
   b. Warten Sie 30 Sekunden.
   c. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
2. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.
3. Mit einer Pipette mit feiner Spitze restliches EtOH aus jedem Well entfernen.
4. Entsorgen Sie überschüssiges 80%iges Ethanol.

Eluieren

1. Entfernen Sie die BIND1 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Invertieren Sie RSB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
3. Fügen Sie jedem Proben-Well 22 µl RSB hinzu.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BIND1 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
6. Inkubieren Sie 2 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „PCF“ (gereinigte cDNA-Fragmente).
   Verwenden Sie eine PCR-Platte, wenn Sie am *SICHERER HALTEPUNKT* auf Seite 50 unterbrechen.
9. Übertragen Sie 20 µl Eluat aus jedem Proben-Well von der BIND1 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der PCF-Platte.
10. Entsorgen Sie die leere BIND1 MIDI-Platte.
11. Fügen Sie jedem Proben-Well der PCF-Platte 30 µl RSB hinzu.
12. Pipettieren Sie zum Mischen zehnmal.
13. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der PCF-Platte an und lagern Sie sie gekühlt.
14. Lagern Sie EPH3, FSM, RVT und SSM wieder.
15. Wenn Sie ausschließlich aus RNA (cDNA) gewonnene Proben verarbeiten und nicht am sicheren Haltepunkt unterbrechen, fahren Sie mit *Durchführung von Endreparatur und A-Tailing* auf Seite 54 fort.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, zentrifugieren Sie die PCF PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

1. Entnehmen Sie die DNA-Kontrollproben aus dem Lagerort.
2. Entnehmen Sie das Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (Artikel-Nr. 20031119)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
TEB	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Fragmentierung der gDNA

Fragmentierung der gDNA

In diesem Prozess wird die gDNA fragmentiert und es werden dsDNA-Fragmente mit 3'- oder 5'-Überhängen erstellt.

Vorbereitung

1. Folgen Sie bei der Quantifizierung von Proben den Empfehlungen in *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28.
2. TEB vorbereiten – Invertieren Sie das Reagenz zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.

Verfahren

Vorbereiten der Platte

Bereiten Sie die Platte mit einer der folgenden Optionen vor:

- Verarbeiten Sie gDNA-Proben gleichzeitig mit cDNA-Proben in der PCF MIDI-Platte.
  a. Beschriften Sie die PCF MIDI-Platte mit „LP“ (Bibliotheksvorbereitung).
  b. Lagern Sie sie bis zur weiteren Verwendung gemäß *Übertragen von fragmentierter DNA* auf Seite 52 gekühlt.
- Verarbeiten Sie gDNA-Proben zeitgleich mit cDNA-Proben. Die PCF PCR-Platte ist gefroren.
  a. Tauen Sie die PCF PCR-Platte auf Raumtemperatur auf.
  b. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 280 × g.
  c. Pipettieren Sie zum Mischen zehnmal.
  d. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „LP“ (Bibliotheksvorbereitung).
  e. Übertragen Sie die gesamten 50 µl jeder Probe von der PCF PCR-Platte in den entsprechenden Well der LP MIDI-Platte.
  f. Entsorgen Sie die PCF PCR-Platte.
  g. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an und lagern Sie die Platte bis zum Schritt *Übertragen von fragmentierter DNA* auf Seite 52 gekühlt.
- Verarbeiten Sie ausschließlich gDNA-Proben.
  a. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „LP“ (Bibliotheksvorbereitung).
  Verwenden Sie eine PCR-Platte, wenn Sie am *SICHERER HALTEPUNKT* auf Seite 52 unterbrechen.
  b. Decken Sie die Platte ab und lagern Sie sie bis zur weiteren Verwendung gemäß *Übertragen von fragmentierter DNA* auf Seite 52.

Verdünnen von gDNA

1. Tauen Sie gDNA-Proben und DNA-Kontrollproben bei Raumtemperatur auf.
2. Pipettieren Sie jede gDNA-Probe zehnmal, um sie zu mischen.

3. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen zu sammeln.
4. Invertieren Sie TEB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
5. Bereiten Sie mithilfe von TEB jeder gDNA-Probe in einem Endvolumen von 52 µl vor. In der folgenden Tabelle finden Sie die Zugabemengen und Mindestkonzentrationen basierend auf dem Typ der Probe.
   - Für den Assay ist eine Mindestextraktionskonzentration erforderlich, damit bei einem Volumen von 52 µl mindestens 40 µl TEB zur Verfügung stehen.
   - Beachten Sie bei DNA-Kontrollproben die auf dem Röhrchenetikett angegebene Konzentration.
   - Vermeiden Sie Probenverluste, indem Sie mindestens 2 µl der Probe in diese Verdünnung pipettieren.

Probentyp	Zugabemenge (ng)	Mindestkonzentration (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Control (Kontrolle)	40	Siehe Röhrchenetikett

Fragmentieren

1. Geben Sie von jeder gDNA-Probe 52 µl in ein separates Well des Ultraschallröhrchens.

   ⚠ VORSICHT

   Geben Sie die gDNA langsam in das Röhrchen und stellen Sie sicher, dass keine Lufteinschlüsse am Röhrchenboden vorhanden sind. Weitere Informationen finden Sie unter *Assay* auf Seite 30 und in den Anweisungen des Herstellers.

2. Dokumentieren Sie die Ausrichtung des Streifens.
3. Fragmentieren Sie gDNA mit dem Ultraschallgerät.

Übertragen von fragmentierter DNA

1. Stellen Sie sicher, dass das Layout der Probenplatte und die Indizes der einzelnen Proben dem Lauf entsprechen, den Sie zur Analyse mit dem TSO Comprehensive-Analysemodul (EU) auswählen.
2. Befolgen Sie die Anweisungen des Ultraschallgeräteherstellers zum Zurückgewinnen der Probe.
   Bei einigen Röhrchentypen des Ultraschallgeräts ist zur Konsolidierung der Probe im Röhrchen ein Zentrifugationsschritt erforderlich.
3. Übertragen Sie mit einer Pipette mit feinen Spitzen von jeder Probe fragmentierter gDNA dreimal 16,7 µl in einen leeren Well der LP MIDI-Platte.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP MIDI-Platte an.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, bringen Sie eine selbsthaftende Verschlussfolie an der LP PCR-Platte an und zentrifugieren Sie sie 1 Minute lang bei 280 × g. Lagern Sie die Platte bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

Vergewissern Sie sich, dass die Programme des Thermocyclers für die Nachamplifikation konfiguriert sind. Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.

1. Bereiten Sie einen Eiskübel oder vergleichbares vor.
2. Entnehmen Sie die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (Artikel-Nr. 20031118)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
ERA1-A	-25 bis -15 °C	Kühl lagern.	Durchführung von Endreparatur und A-Tailing
ERA1-B	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Durchführung von Endreparatur und A-Tailing
ALB1	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Adapter-Ligation
LIG3	-25 bis -15 °C	Kühl lagern.	Adapter-Ligation
SUA1 (blauer Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Adapter-Ligation
UMI (weißer Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Adapter-Ligation
STL	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Adapter-Ligation
EPM	-25 bis -15 °C	Kühl lagern.	Index PCR

Tabelle 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (Artikel-Nr. 20031119)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
SPB (hellgrünes Etikett)	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Reinigung der Ligation
RSB	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Reinigung der Ligation

Tabelle 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (Artikel-Nr. 20031120)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
UPxx	-25 bis -15 °C	Tauen Sie die entsprechenden Index-Primer-Röhrchen auf, bis sie Raumtemperatur erreichen.	Index PCR

Tabelle 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (Artikel-Nr. 20031126)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
CPxx	-25 bis -15 °C	Tauen Sie die entsprechenden Index-Primer-Röhrchen auf, bis sie Raumtemperatur erreichen.	Index PCR

Durchführung von Endreparatur und A-Tailing

In diesem Prozess werden die bei der Fragmentierung entstandenen Überhänge mithilfe einer ERA1-Master-Mischung (Endreparatur und A-Tailing) repariert und Enden mit A-Tail-Überhängen generiert.

Durch die 3'-auf-5'-Exonuklease-Aktivität dieser Mischung werden die 3'-Überhänge entfernt. Durch die 5'-auf-3'-Polymerase-Aktivität werden die 5'-Überhänge aufgefüllt. Durch A-Tailing der 3'-Enden während dieser Reaktion wird verhindert, dass die Enden während der Adapterligation aneinander ligiert werden.

Vorbereitung

1. Erwärmen Sie folgendermaßen 2 Mikroproben-Inkubatoren mit MIDI-Hitzeblock-Einsätzen.
   - Erwärmen Sie einen Mikroproben-Inkubator auf 30 °C.
   - Erwärmen Sie einen Mikroproben-Inkubator auf 72 °C.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - ERA1-A: Zentrifugieren Sie kurz und pipettieren Sie anschließend zum Mischen. Kühl lagern.
   - ERA1-B: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz. Untersuchen Sie das Reagenz auf Präzipitationen. Wenn Präzipitationen auftreten, erwärmen Sie das Röhrchen auf 37 °C und pipettieren Sie anschließend zum Mischen, bis sich die Präzipitationen aufgelöst haben.

3. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen die ERA1-Master-Mischung vor.

   Tabelle 21 ERA1-Master-Mischung*

Komponente Master-Mischung	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
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

   * Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Siehe *Handhabung von Reagenzien* auf Seite 34 für Berechnungen.

4. Pipettieren Sie zehnmal langsam, um Homogenität zu gewährleisten und zentrifugieren Sie anschließend kurz. Lagern Sie die ERA1-Master-Mischung gekühlt.
5. Bereiten Sie die Platte mit einer der folgenden Optionen vor.
   - Wenn sich die Proben in einer MIDI-Platte befinden, wie folgt vorbereiten.
     a. Ändern Sie die Beschriftung der MIDI-Platte in „LP2“ (Bibliotheksvorbereitung 2).
     b. Wenn sich Proben in unterschiedlichen MIDI-Platten befinden, sollten Sie sämtliche Proben in separate Wells derselben MIDI-Platte geben. Beachten Sie dabei das Plattenlayout.
   - Wenn die Platte eingefroren ist, wie folgt vorbereiten.
     a. Tauen Sie die PCF PCR- oder LP PCR-Platte auf Raumtemperatur auf.
     b. Zentrifugieren Sie die Platte 1 Minute lang bei 280 × g.
     c. Pipettieren Sie zum Mischen zehnmal.
     d. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „LP2“ (Bibliotheksvorbereitung 2).
     e. Übertragen Sie die gesamten 50 µl jeder Probe der PCF PCR-Platte oder der LP PCR-Platte in den entsprechenden Well der LP2 MIDI-Platte.
     f. Entsorgen Sie die PCF PCR- bzw. LP PCR-Platte.

Verfahren

1. Fügen Sie jedem Proben-Well der LP2 MIDI-Platte 10 µl ERA1-Master-Mischung hinzu.
2. Entsorgen Sie die restliche ERA1-Master-Mischung.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
4. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
5. Inkubieren Sie die Platte 30 Minuten lang im auf 30 °C vorgewärmten Mikroproben-Inkubator.
6. Platzieren Sie die Platte anschließend sofort in einem zweiten, vorgewärmten Mikroproben-Inkubator.
7. Inkubieren Sie die Platte 20 Minuten lang bei 72 °C.
8. Lagern Sie die LP2 MIDI-Platte 5 Minuten gekühlt.

Adapter-Ligation

Mit diesem Prozess werden Adapter an die Enden der cDNA- und/oder gDNA-Fragmente ligiert.

Der TSO Comprehensive (EU)-Assay beinhaltet SUA1- und UMI-Adapter.

- Verwenden Sie SUA1-Adapter für RNA-Proben.
- Verwenden Sie UMI-Adapter für DNA-Proben.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - ALB1: Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - LIG3: Zentrifugieren Sie kurz und pipettieren Sie zum Mischen. Kühl lagern.
   - SUA1: Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - UMI: Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - STL: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.

Verfahren

1. Nehmen Sie die LP2 MIDI-Platte vom Eis bzw. dem entsprechenden Material.
2. Fügen Sie zu jedem Proben-Well der LP2 MIDI-Platte 60 µl ALB1 hinzu. ALB1 ist eine viskose Lösung. Pipettieren Sie langsam, um die Blasenbildung zu minimieren.
3. Fügen Sie jedem Proben-Well 5 µl LIG3 hinzu.
4. Fügen Sie Adapter wie folgt hinzu.
   Verschiedene Adaptertypen dürfen *nicht* miteinander kombiniert werden.
   - **[RNA-Proben-Wells]**—10 µl SUA1 (blauer Verschluss) zu jeder aus RNA gewonnenen Probe
   - **[DNA-Proben-Wells]**—10 µl UMI (weißer Verschluss) zu jeder aus DNA gewonnenen Probe
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
7. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
8. Mischen Sie STL mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
9. Fügen Sie zu jedem Proben-Well der LP2 MIDI-Platte 5 µl STL hinzu.
10. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI-Platte an.
    Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
11. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.

Reinigung der Ligation

Bei diesem Prozess werden die adapterligierten cDNA- oder gDNA-Fragmente mit SPB gereinigt und unerwünschte Produkte entfernt. Die Beads durchlaufen zwei Waschläufe mit frischem 80%igem Ethanol. Die adapterligierten Proben werden mit RSB eluiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - SPB: Lagern Sie die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
   - RSB: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
2. Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol in einem konischen Röhrchen mit 15 ml oder 50 ml Fassungsvermögen vor.

   Tabelle 22 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol zu

Reagenz	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
100%iges EtOH, rein	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase-/DNase-freies Wasser	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Mischen Sie frisches 80%iges Ethanol mit dem Vortexmischer.
4. Stellen Sie den Magneten bereit.

Verfahren

Binden

1. Mischen Sie SPB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
2. Fügen Sie jedem Proben-Well der LP2 MIDI-Platte unmittelbar 112 µl SPB hinzu.
   Wenn SPB aus einer Schale verteilt wird, muss bei der Bestimmung des für die einzelnen Proben erforderlichen Materials ein Überschussfaktor von 1,15 einberechnet werden. Entsorgen Sie das übrige Material, nachdem SPB in alle Proben-Wells gegeben wurde.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
4. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
5. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
6. Platzieren Sie die LP2 MIDI-Platte 10 Minuten lang auf dem Magnetstativ.
7. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

Waschlauf

1. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
   a. Platzieren Sie die LP2 MIDI-Platte auf dem Magnetstativ und fügen Sie jedem Proben-Well 200 µl frisches 80%iges Ethanol hinzu.
   b. Warten Sie 30 Sekunden.
   c. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
2. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.
3. Mit einer Pipette mit feiner Spitze restliches EtOH aus jedem Well entfernen.
4. Entsorgen Sie überschüssiges 80%iges Ethanol.

Eluieren

1. Entfernen Sie die LP2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Invertieren Sie RSB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
3. Fügen Sie jedem Proben-Well 27,5 µl RSB hinzu.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
6. Inkubieren Sie 2 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Platzieren Sie die LP2 MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „LS“ (Bibliotheksproben).
9. Übertragen Sie 25 µl von jedem Eluat von der LP2 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der LS PCR-Platte.
10. Entsorgen Sie die leere LP2 MIDI-Platte.

Index PCR

In diesem Schritt werden Bibliotheksfragmente mithilfe von Primern, die Indexsequenzen für das Proben-Multiplexing anfügen, amplifiziert. Das daraus resultierende Produkt enthält die vollständige Bibliothek der cDNA- und/oder DNA-Fragmente mit flankierenden Adaptern, die für die Clusterbildung erforderlich sind.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - EPM – Kühl lagern.
   - UPxx: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie kurz. UPxx ist der während der Laufkonfiguration in der Local Run Manager im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) ausgewählte Index-Primer.

- CPxx: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie kurz. UPxx ist der während der Laufkonfiguration in der Local Run Manager im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) ausgewählte Index-Primer.

2. Stellen Sie während der Laufkonfiguration sicher, dass die Indizes der einzelnen Proben dem während der Laufkonfiguration in TSO Comprehensive-Analysemodul (EU) geplanten Lauf entsprechen. Befolgen Sie die Anweisungen hinsichtlich der Index-Auswahl unter *Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes* auf Seite 36.

⚠ VORSICHT

Abweichungen zwischen den Proben und Index-Primern führen aufgrund der fehlenden eindeutigen Identifikation der Proben zu falschen Ergebnisberichten.

Verfahren

1. Fügen Sie gemäß der Auswahl der Indizes 5 µl des entsprechenden Index-Primers (UPxx oder CPxx) zum entsprechenden Proben-Well auf der LS PCR-Platte hinzu.

⚠ VORSICHT

Bearbeiten und öffnen Sie jeweils immer nur ein Index-Primer-Röhrchen. Schließen Sie jedes Index-Röhrchen unmittelbar nach der Verwendung mit einer neuen Kappe. Index-Primer dürfen nicht kombiniert werden.

2. Mischen Sie EPM 5 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
3. Fügen Sie jedem Proben-Well 20 µl EPM hinzu.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LS PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
5. Schütteln Sie 1 Minute lang bei 1.200 rpm.
6. Lagern Sie die Voramplifikationsreagenzien wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.

⚠ VORSICHT

Führen Sie alle nachfolgenden Schritte in einem Nachamplifikationsbereich durch, um eine Übertragung von Amplifikationsprodukten zu vermeiden.

7. Zentrifugieren Sie die LS PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g.
8. Platzieren Sie die Platte auf dem vorprogrammierten Thermocycler für die Nachamplifikation und führen Sie das Programm „I-PCR“ aus.
   Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
   Wenn Sie mit *Konfiguration der ersten Hybridisierung* auf Seite 61 fortfahren, befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen von Reagenzien im Abschnitt „Vorbereitung für Protokollschritte“.
9. Zentrifugieren Sie nach Abschluss des Programms „I-PCR“ die LS PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g.
10. Ändern Sie die Beschriftung der Platte in „ALS“ (amplifizierte Bibliotheksproben).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, versiegeln Sie die ALS PCR-Platte und lagern Sie sie bis zu 30 Tage lang bei -25 bis -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zur Hybridisierung über Nacht durchzuführen.

1. Vergewissern Sie sich, dass die Programme des Thermocyclers für die Nachamplifikation konfiguriert sind. Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
2. Entnehmen Sie die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (Artikel-Nr. 20031123)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
TCB1	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Konfiguration der ersten Hybridisierung

Tabelle 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (Artikel-Nr. 20031121)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
TCA1	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Konfiguration der ersten Hybridisierung

Tabelle 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (Artikel-Nr. 20031122)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
OPR1 (roter Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Konfiguration der ersten Hybridisierung
OPD2 (weißer Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Konfiguration der ersten Hybridisierung

Konfiguration der ersten Hybridisierung

Während dieses Prozesses wird ein Oligo-Pool in cDNA-Bibliotheken hybridisiert und ein Oligo-Pool wird in gDNA-Bibliotheken hybridisiert. Die Bibliotheken wurden gemäß *Index PCR* auf Seite 58 vorbereitet. Die Anreicherung von Zielregionen muss in zwei Hybridisierungsschritten erfolgen. Während der ersten Hybridisierung werden Oligos über Nacht (über eine Dauer von 8 bis 24 Stunden) an cDNA- und/oder gDNA-Bibliotheken hybridisiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - TCB1: Erwärmen Sie das Röhrchen 5 Minuten lang bei 37 °C. Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - TCA1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

- OPR1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
- OPD2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

2. Wenn die ALS PCR-Platte gelagert wurde, tauen Sie sie auf Raumtemperatur auf. Zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei 280 × g. Pipettieren Sie zum Mischen.
3. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „HYB1“ (Hybridisierung 1).

Verfahren

1. Übertragen Sie 20 µl jeder cDNA- und/oder gDNA-Bibliothek von der ALS PCR-Platte in den entsprechenden Well der HYB1 PCR-Platte.
2. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ALS PCR-Platte an und stellen Sie die Platte beiseite. Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
3. Untersuchen Sie TCB1 auf Präzipitationen. Wenn Präzipitationen vorhanden sind, erwärmen Sie das Röhrchen erneut und mischen Sie es mit dem Vortexmischer, bis die Kristalle gelöst sind.
4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der HYB1 PCR-Platte 15 µl TCB1 hinzu.
5. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der HYB1 PCR-Platte 10 µl TCA1 hinzu.
6. Fügen Sie die Sonden hinzu.
   Verschiedene Sondentypen dürfen *nicht* miteinander kombiniert werden. Nur ein Sonden-Set pro Well hinzufügen.
   - **[RNA-Bibliotheks-Wells]**—5 µl OPR1 (roter Verschluss) in jede aus RNA gewonnene Bibliothek.
   - **[DNA-Bibliotheks- Wells]**—5 µl OPD2 (weißer Verschluss) in jede aus DNA gewonnene Bibliothek.
7. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der HYB1 PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
8. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.200 rpm.
9. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm „HYB1“ aus.
   Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
10. Hybridisieren Sie mindestens 8 Stunden und höchstens 24 Stunden lang bei 57 °C.
11. Lagern Sie die Hybridisierungsreagenzien wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.
12. Lagern Sie die ALS PCR-Platte 30 Tage lang bei einer Temperatur zwischen -25 °C und -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

Entnehmen Sie zu Beginn von Tag 2 das Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (Artikel-Nr. 20031123)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
SMB (dunkelblaues Etikett)	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Capture 1 Capture 2
ET2	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Capture 1 Capture 2
HP3	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Capture 1 Capture 2 Normalisieren der Bibliotheken
TCB1	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Konfiguration der zweiten Hybridisierung
RSB	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Capture 2 Reinigung der amplifizierten angereicherten Bibliothek

Tabelle 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (Artikel-Nr. 20031121)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
EE2	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Capture 1 Capture 2 Normalisieren der Bibliotheken
EEW	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Capture 1
TCA1	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Konfiguration der zweiten Hybridisierung

Tabelle 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (Artikel-Nr. 20031122)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
OPR1 (roter Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Konfiguration der zweiten Hybridisierung
OPD2 (weißer Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Konfiguration der zweiten Hybridisierung

Capture 1

In diesem Schritt werden mit SMB Sonden erfasst, die an Zielregionen von Interesse hybridisiert wurden. Für die Beads wird ein dritter Waschlauf mit EEW durchgeführt. Die angereicherten Bibliotheken werden mit frischer EE2 + HP3-Elutionsmischung eluiert und mit ET2 neutralisiert.

Vorbereitung

1. Erwärmen Sie einen Mikroproben-Inkubator mit MIDI-Hitzeblock-Einsatz auf 57 °C.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - EEW: Mischen Sie das Reagenz 1 Minute lang mit dem Vortexmischer.
   - EE2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - HP3: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - SMB: Lagern Sie die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
     Für dieses Verfahren müssen Sie unbedingt **SMB** verwenden, keinesfalls SPB.
   - ET2: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
3. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen frische EE2 + HP3-Elutionsmischung vor.

   Tabelle 29 EE2 + HP3-Elutionsmischung für Capture One*

Komponente Elutionsmischung	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

   * Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Siehe *Handhabung von Reagenzien* auf Seite 34 für Berechnungen.
4. Mischen Sie EE2 + HP3-Elutionsmischung mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz. Für das *Eluieren* auf Seite 66 beiseite legen.
5. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „CAP1“ (Erfassung 1).
6. Stellen Sie den Magneten bereit.

Verfahren

Binden

1. Entfernen Sie die HYB1 PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Zentrifugieren Sie die HYB1 PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g.
3. Mischen Sie SMB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
   Wenn sich ein Niederschlag oder das Bead-Pellet gebildet hat, auf Raumtemperatur bringen, pipettieren, um das Pellet zu lösen, und dann vortexen, um es wieder in Suspension zu bringen.

4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP1 MIDI-Platte unmittelbar 150 µl SMB hinzu.
   Wenn SMB aus einer Schale entnommen wird, muss bei der Bestimmung des für die einzelnen Proben erforderlichen Materials ein Überschussfaktor von 1,15 einberechnet werden.
5. Entsorgen Sie das übrige Material, nachdem SMB in alle Proben-Wells gegeben wurde.
6. Stellen Sie eine Pipette auf 50 µl ein und übertragen Sie das gesamte Volumen aus jeder Bibliothek der HYB1 PCR-Platte in den entsprechenden Well der CAP1 MIDI-Platte.
7. Entsorgen Sie die leere HYB1 PCR-Platte.
8. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP1 MIDI-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
9. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
10. Inkubieren Sie die Platte 25 Minuten lang im auf 57 °C vorgewärmten Mikroproben-Inkubator.
11. Platzieren Sie die CAP1 MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
12. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

⚠ VORSICHT

Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt (*Waschlauf* auf Seite 66) fort. Die Bead-Pellets dürfen nicht längere Zeit ohne Flüssigkeit sein.

Waschlauf

1. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
   a. Entfernen Sie die CAP1 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
   b. Fügen Sie jedem Well 200 µl EEW hinzu.
   c. Stellen Sie eine Pipette auf 150 µl ein und pipettieren Sie mindestens zehnmal, um die Lösung zu mischen. Stellen Sie sicher, dass alle Beads resuspendiert sind.
      Stellen Sie sicher, dass keine Bead-Pellets vorhanden sind, indem Sie die gesamte Bead-Lösung des Wells vorsichtig in die Spitze aspirieren. Überprüfen Sie den Boden jeder Vertiefung mit einer Sichtprüfung. Wenn ein Bead-Pellet vorhanden ist, winkeln Sie während des Waschlaufs die Pipettenspitze in Richtung des Pellets an, um das Pellet zu lösen. Das Bead-Pellet muss vollständig in der Lösung eintauchen. Die Lösung muss eine dunkelbraune Farbe und eine homogene Konsistenz aufweisen.
   d. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP1 MIDI-Platte an.
   e. Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
   f. Schütteln Sie 4 Minuten lang bei 1.800 rpm.
   g. Inkubieren Sie die Platte 5 Minuten lang bei 57 °C im Mikroproben-Inkubator.
   h. Platzieren Sie die CAP1 MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
   i. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
2. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.
3. Führen Sie einen **dritten** Waschlauf für die Beads durch.
4. Mit einer Pipette mit feiner Spitze restliches EEW aus jedem Well entfernen.

Eluieren

1. Entfernen Sie die CAP1 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Mischen Sie frische EE2 + HP3-Elutionsmischung mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP1 MIDI-Platte 17 µl EE2 + HP3-Elutionsmischung hinzu.
4. Entsorgen Sie die verbleibende EE2 + HP3-Elutionsmischung.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP1 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „ELU1“ (Elution 1).
9. Mischen Sie ET2 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
10. Fügen Sie jedem entsprechenden Bibliotheks-Well der neuen ELU1 PCR-Platte 5 µl ET2 hinzu.

11. Übertragen Sie vorsichtig 15 µl Eluat aus jedem Bibliotheks-Well der CAP1 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der ELU1 PCR-Platte.
12. Entsorgen Sie die leere CAP1 MIDI-Platte.
13. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ELU1 PCR-Platte an.
    Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
14. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.200 rpm.
15. Lagern Sie EEW wieder ein.

Konfiguration der zweiten Hybridisierung

In diesem Schritt werden die Zielregionen der angereicherten cDNA- und/oder gDNA-Bibliotheken mit Erfassungssonden ein zweites Mal gebunden. Durch die zweite Hybridisierung wird die hohe Spezifität der erfassten Regionen gewährleistet. Führen Sie den zweiten Hybridisierungsschritt mindestens 1,5 Stunden und höchstens 4 Stunden lang bei 57 °C aus, um eine optimale Bibliotheksanreicherung sicherzustellen.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - TCB1: Erwärmen Sie das Röhrchen 5 Minuten lang bei 37 °C. Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - TCA1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - OPR1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - OPD2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

Verfahren

1. Untersuchen Sie TCB1 auf Präzipitationen. Wenn Präzipitationen vorhanden sind, erwärmen Sie das Röhrchen erneut und mischen Sie es mit dem Vortexmischer, bis die Kristalle gelöst sind.
2. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der ELU1 PCR-Platte 15 µl TCB1 hinzu.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well 10 µl TCA1 hinzu.
4. Fügen Sie in jede Vertiefung die gleiche Probe hinzu, die bei der ersten Hybridisierung verwendet wurde. Nur ein Sonden-Set pro Well hinzufügen.
   Verschiedene Sondentypen dürfen *nicht* miteinander kombiniert werden.
   - **[RNA-Bibliotheks-Wells]**—5 µl OPR1 (roter Verschluss) in jede aus RNA gewonnene Bibliothek.
   - **[DNA-Bibliotheks-Wells]**—5 µl OPD2 (weißer Verschluss) in jede aus DNA gewonnene Bibliothek.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ELU1 PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
6. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.200 rpm.
7. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm „HYB2“ aus.

Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.

8. Hybridisieren Sie mindestens 1,5 Stunden und höchstens 4 Stunden lang bei 57 °C.
9. Lagern Sie die Hybridisierungsreagenzien wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.

Capture 2

In diesem Schritt werden mit SMB Sonden erfasst, die an Zielregionen von Interesse hybridisiert wurden. Für die Beads wird ein Waschlauf einmal mit RSB durchgeführt. Die angereicherten Bibliotheken werden mit frischer EE2 + HP3-Elutionsmischung eluiert und mit ET2 neutralisiert.

Vorbereitung

1. Erwärmen Sie einen Mikroproben-Inkubator mit MIDI-Hitzeblock-Einsatz auf 57 °C.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - EE2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - HP3: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - SMB: Lagern Sie die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
     Für dieses Verfahren müssen Sie unbedingt **SMB** verwenden, keinesfalls SPB.
   - RSB: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
   - ET2: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
3. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen frische EE2 + HP3-Elutionsmischung vor.

   Tabelle 30 EE2 + HP3-Elutionsmischung für Capture Zwei*

Komponente Elutionsmischung	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

   * Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Siehe *Handhabung von Reagenzien* auf Seite 34 für Berechnungen.
4. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz. *Eluieren* auf Seite 70 legen.
5. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „CAP2“ (Erfassung 2).
6. Stellen Sie den Magneten bereit.

Verfahren

Binden

1. Entfernen Sie die ELU1 PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Zentrifugieren Sie die ELU1 PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g.

3. Mischen Sie SMB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
   Wenn sich ein Niederschlag oder das Bead-Pellet gebildet hat, bringen Sie es auf Raumtemperatur, pipettieren Sie es, um das Pellet zu lösen, und vortexen Sie es, um es wieder in Suspension zu bringen.
4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP2 MIDI-Platte unmittelbar 150 µl SMB hinzu.
   Wenn SMB aus einer Schale entnommen wird, muss bei der Bestimmung des für die einzelnen Proben erforderlichen Materials ein Überschussfaktor von 1,15 einberechnet werden.
5. Entsorgen Sie das übrige Material, nachdem SMB in alle Proben-Wells gegeben wurde.
6. Stellen Sie eine Pipette auf 50 µl ein und übertragen Sie das gesamte Volumen aus jeder Bibliothek der ELU1 PCR-Platte in den entsprechenden Well der CAP2 MIDI-Platte.
7. Entsorgen Sie die leere ELU1 PCR-Platte.
8. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP2 MIDI-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
9. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
10. Inkubieren Sie die Platte 25 Minuten lang bei 57 °C im Mikroproben-Inkubator.
    Wenn Sie mit *Amplifikation der angereicherten Bibliothek* auf Seite 72 fortfahren, befolgen Sie die Anweisungen für die Reagenzien im Abschnitt Protokollschritte vorbereiten.
11. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
12. Belassen Sie die CAP2 MIDI-Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

⚠ VORSICHT

Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt (*Waschlauf* auf Seite 69) fort. Die Bead-Pellets dürfen nicht längere Zeit ohne Flüssigkeit sein.

Waschlauf

1. Entfernen Sie die CAP2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Invertieren Sie RSB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
3. Fügen Sie jedem Well 200 µl RSB hinzu.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP2 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie 4 Minuten lang bei 1.800 rpm.
6. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf dem Magnetstativ.
7. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
8. Entfernen Sie mit einer Pipette mit feiner Spitze restliches RSB aus jedem Well.

Eluieren

1. Entfernen Sie die CAP2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Mischen Sie frische EE2 + HP3-Elutionsmischung mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP2 MIDI-Platte 22 µl EE2 + HP3-Elutionsmischung hinzu.
4. Entsorgen Sie die verbleibende EE2 + HP3-Elutionsmischung.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP2 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „ELU2“ (Elution 2).
9. Mischen Sie ET2 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
10. Fügen Sie jedem entsprechenden Bibliotheks-Well der neuen ELU2 PCR-Platte 5 µl ET2 hinzu.
11. Übertragen Sie vorsichtig 20 µl Eluat aus jedem Bibliotheks-Well der CAP2 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der ELU2 PCR-Platte.
12. Entsorgen Sie die leere CAP2 MIDI-Platte.
13. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ELU2 PCR-Platte an.
    Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
14. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.200 rpm.
15. Lagern Sie SMB, EE2, HP3, RSB und ET2 wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, zentrifugieren Sie die ELU2 PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

1. Bereiten Sie einen Eiskübel oder vergleichbares vor.
2. Entnehmen Sie die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (Artikel-Nr. 20031121)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
PPC3	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Amplifikation der angereicherten Bibliothek
EPM	-25 bis -15 °C	Kühl lagern.	Amplifikation der angereicherten Bibliothek

Tabelle 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (Artikel-Nr. 20031123)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
SPB (hellgrünes Etikett)	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Reinigung der amplifizierten angereicherten Bibliothek
RSB	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Reinigung der amplifizierten angereicherten Bibliothek Vorbereitung für die Sequenzierung

Amplifikation der angereicherten Bibliothek

In diesem Schritt werden angereicherte Bibliotheken mithilfe von Primern amplifiziert.

Vorbereitung

1. Wenn die ELU2-Platte gelagert wurde, tauen Sie sie auf Raumtemperatur auf. Zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei 280 × g.

Verfahren

1. Mischen Sie PPC3 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
2. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der ELU2 PCR-Platte 5 µl PPC3 hinzu.
3. Mischen Sie EPM 5 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well 20 µl EPM hinzu.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ELU2 PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
6. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.200 rpm.
7. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm „EL-PCR“ aus.
   Siehe *Programmieren des Thermocyclers* auf Seite 43.
   Wenn Sie mit *Normalisieren der Bibliotheken* auf Seite 75 fortfahren, befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen im Abschnitt Protokollschritte vorbereiten.
8. Lagern Sie PPC3 und EPM wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.

Reinigung der amplifizierten angereicherten Bibliothek

In diesem Schritt werden die angereicherten Bibliotheken mithilfe von SPB von unerwünschten Reaktionskomponenten gereinigt. Die Beads durchlaufen zwei Waschläufe mit frischem 80%igem Ethanol. Die Bibliotheken werden mit RSB eluiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - SPB: Lagern Sie die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Für dieses Verfahren müssen Sie unbedingt **SPB** verwenden, keinesfalls SMB.
   - RSB: Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
2. Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol in einem konischen Röhrchen mit 15 ml oder 50 ml Fassungsvermögen vor.

Tabelle 33 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol zu

Reagenz	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
100%iges EtOH, rein	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase-/DNase-freies Wasser	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Mischen Sie frisches 80%iges Ethanol mit dem Vortexmischer.
4. Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „BIND2“ (Reinigungsbindung).
5. Stellen Sie den Magneten bereit.

Verfahren

Binden

1. Entfernen Sie die ELU2 PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Zentrifugieren Sie die ELU2 PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g.
3. Mischen Sie SPB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der BIND2 MIDI-Platte unmittelbar 110 µl SPB hinzu.
5. Übertragen Sie 50 µl Eluat jeder Bibliothek von der ELU2 PCR-Platte in den entsprechenden Well der BIND2 MIDI-Platte.
6. Entsorgen Sie die leere ELU2 PCR-Platte.
7. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BIND2 MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
8. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
9. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
10. Platzieren Sie die BIND2 MIDI-Platte 5 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
11. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

Waschlauf

1. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
   a. Platzieren Sie die BIND2 MIDI-Platte auf dem Magnetstativ und fügen Sie jedem Well 200 µl frisches 80%iges Ethanol hinzu.
   b. Warten Sie 30 Sekunden.
   c. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
2. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.

3. Mit einer Pipette mit feiner Spitze restliches EtOH aus jedem Well entfernen.
4. Entsorgen Sie überschüssiges 80%iges Ethanol.

Eluieren

1. Entfernen Sie die BIND2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Invertieren Sie RSB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well 32 µl RSB hinzu.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BIND2 MIDI-Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
6. Inkubieren Sie 2 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „PL“ (gereinigte Bibliotheken).
9. Übertragen Sie 30 µl von jedem Eluat von der BIND2 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der PL PCR-Platte.
10. Entsorgen Sie die leere BIND2 MIDI-Platte.
11. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der PL PCR-Platte an.
12. Lagern Sie SPB und RSB wieder ein.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, zentrifugieren Sie die PL PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte bis zu 30 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

1. Entnehmen Sie die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (Artikel-Nr. 20031121)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
LNA1	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Normalisieren der Bibliotheken
EE2	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht.	Normalisieren der Bibliotheken

Tabelle 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (Artikel-Nr. 20031123)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
LNB1	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Normalisieren der Bibliotheken
HP3	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Normalisieren der Bibliotheken Vorbereitung für die Sequenzierung
LNW1	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Normalisieren der Bibliotheken
LNS1	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Normalisieren der Bibliotheken

2. Wenn Sie noch am gleichen Tag mit *Vorbereitung für die Sequenzierung* auf Seite 79 fortfahren, befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen im Abschnitt Protokollschritte vorbereiten.

Normalisieren der Bibliotheken

Mit diesem Prozess wird die Menge jeder Bibliothek mithilfe von LNB1 und Additiven (LNA1) normalisiert, um in den gepoolten Bibliotheken eine einheitliche Bibliotheksrepräsentation zu gewährleisten. Für die Beads werden zwei Waschläufe mit LNW1 durchgeführt. Die Bibliotheken werden mit frischer EE2 + HP3-Elutionsmischung eluiert und mit LNS1 neutralisiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:
   - LNB1: Lagern Sie die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
   - LNA1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer.
   - EE2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - HP3: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
   - LNW1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer. Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
   - LNS1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer. Halten Sie das Reagenz für den Einsatz in diesem Verfahren bereit.
2. Mischen Sie LNB1 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren. Invertieren Sie das LNB1-Röhrchen, um zu gewährleisten, dass alle Beads resuspendiert sind.
3. Stellen Sie eine Pipette auf 800 µl ein und pipettieren Sie LNB1 zehnmal auf und ab, um die Resuspension zu gewährleisten.
4. Bereiten Sie sofort in einem konischen Röhrchen eine frische LNA1 + LNB1-Master-Mischung vor.

⚠ VORSICHT

Resuspendieren Sie das LNB1-Bead-Pellet vollständig am Boden des Röhrchens, um eine uneinheitliche Clusterdichte zu vermeiden.

Tabelle 36 LNA1 + LNB1-Master-Mischung*

Komponente Master-Mischung	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
LNA1	305 µl	610 µl	1.219 µl	1.829 µl	3.658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Siehe *Handhabung von Reagenzien* auf Seite 34 für Berechnungen.

5. Mischen Sie die LNA1 + LNB1-Master-Mischung mit dem Vortexmischer. Für die *Bindung* auf Seite 76 legen.
6. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen frische EE2 + HP3-Elutionsmischung vor.

Tabelle 37 EE2 + HP3-Elutionsmischung für das Normalisieren der Bibliotheken*

Komponente Elutionsmischung	4 Biblio-theken	8 Biblio-theken	16 Biblio-theken	24 Biblio-theken	48 Biblio-theken
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1.824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Siehe *Handhabung von Reagenzien* auf Seite 34 für Berechnungen.

7. Mischen Sie frische Elutionsmischung mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz. *Eluieren* auf Seite 77 legen.
8. Wenn die PL PCR-Platte gelagert wurde, tauen Sie sie auf Raumtemperatur auf. Zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei 280 × g. Pipettieren Sie zum Mischen.
9. Beschriften Sie eine neue 96-Well-Midi-Platte mit „BBN“ (beadbasierte Normalisierung).
10. Stellen Sie den Magneten bereit.

Verfahren

Bindung

1. Mischen Sie die LNA1+LNB1-Master-Mischung mit dem Vortexmischer.
2. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der BBN MIDI-Platte unmittelbar 45 µl LNA1 + LNB1-Master-Mischung hinzu.
3. Entsorgen Sie die restliche LNA1 + LNB1-Master-Mischung.
4. Geben Sie 20 µl aus jeder Bibliothek der PL PCR-Platte in den entsprechenden Well der BBN MIDI-Platte.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BBN MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.

6. Schütteln Sie 30 Minuten lang bei 1.800 rpm.
7. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der PL PCR-Platte an und lagern Sie diese.
8. Platzieren Sie die BBN MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
9. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

Waschlauf

1. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
   a. Entfernen Sie die BBN MIDI-Platte vom Magnetstativ.
   b. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well 45 µl LNW1 hinzu.
   c. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BBN MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
   d. Schütteln Sie 5 Minuten lang bei 1.800 rpm.
   e. Platzieren Sie die BBN MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
   f. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
2. Führen Sie einen *zweiten* Waschlauf für die Beads durch.
3. Entfernen Sie mit einer Pipette mit feiner Spitze den verbliebenen Überstand aus jedem Well.

Eluieren

1. Entfernen Sie die BBN MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Mischen Sie frische EE2 + HP3-Elutionsmischung mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der BBN MIDI-Platte 32 µl EE2 + HP3-Lösung hinzu.
4. Entsorgen Sie die verbleibende Elutionsmischung.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der BBN MIDI-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Schütteln Sie 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „NL“ (normalisierte Bibliotheken).
9. Übertragen Sie vorsichtig 30 µl Eluat aus jedem Bibliotheks-Well der BBN MIDI-Platte in den entsprechenden Well der NL PCR-Platte.

⚠ VORSICHT

Wenn Beads in die Pipettenspitzen aspiriert werden, geben Sie die Beads in die Platte auf dem Magnetstativ zurück. Warten Sie ca. 2 Minuten, bis die Flüssigkeit klar ist, bevor Sie mit dem nächsten Schritt des Verfahrens fortfahren.

10. Entsorgen Sie die leere BBN MIDI-Platte.
11. Mischen Sie LNS1 mit dem Vortexmischer.
12. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der neuen NL PCR-Platte 30 µl LNS1 hinzu.
13. Pipettieren Sie zum Mischen fünfmal.
14. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der NL PCR-Platte an.
    Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
15. Lagern Sie LNB1, LNA1, EE2, LNW1 und LNS1 wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, zentrifugieren Sie die NL PCR-Platte eine Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte bis zu 32 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Protokollschritte vorbereiten

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zur Sequenzierung durchzuführen.

Beginnen Sie mit der Vorbereitung der Sequenzierungsverbrauchsmaterialien aus dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Artikel-Nr. 20028871) mindestens eine Stunde vor deren Verwendung.

1. Nehmen Sie den Bibliotheksverdünnungspuffer (HT1) aus der Lagerung bei -25 °C bis -15 °C. Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht. Nach dem Auftauen kalt halten.
2. Befolgen Siedie Anweisungen zur Vorbereitung in *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)* in Bezug auf die anderen Verbrauchsmaterialien im Kit.
   - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
   - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
   - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. Entnehmen Sie die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (Artikel-Nr. 20031121)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
PhiX Internal Control (PX3 oder PhiX)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz auftauen, bis es Raumtemperatur erreicht. Nach dem Auftauen kalt halten.	Vorbereitung für die Sequenzierung

Tabelle 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (Artikel-Nr. 20031123)

Reagenz	Lagerung	Anweisungen zum Auftauen	Protokollschritt
HP3	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Vorbereitung für die Sequenzierung
RSB (rosa Etikett)	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.	Vorbereitung für die Sequenzierung

Vorbereitung für die Sequenzierung

Jeder DNA- und RNA-Sequenzierungslauf muss eine positive Kontrollprobe und eine NTC umfassen. Die NTCs für DNA und RNA werden jeweils nach Bedarf wiederholt sequenziert, sodass jeder Lauf eine NTC umfasst. Jeder DNA- und RNA-Lauf umfasst eine separate positive Kontrollprobe.

Vorbereitung

1. Machen Sie sich mit den Richtlinien für die *Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes* auf Seite 36 vertraut.
2. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „dHP3“ (verdünntes HP3).

3. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „dPhiX“ (verdünntes PhiX).
4. Erwärmen Sie einen Hitzeblock für Mikrozentrifugenröhrchen auf 96 °C.
5. Bereiten Sie einen Eiskübel oder vergleichbares vor.

Verdünnen und Denaturieren der PhiX-Kontrolle

1. Mischen Sie HP3 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
2. Mischen Sie folgende Volumen im dHP3-Mikrozentrifugenröhrchen.
   - 10 µl HP3
   - 190 µl RNase-/DNase-freies Wasser
3. Mischen Sie dHP3 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
4. Invertieren Sie RSB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
5. Mischen Sie die PhiX-Kontrolle mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
6. Mischen Sie folgende Volumen im dPhiX-Mikrozentrifugenröhrchen.
   - 8 µl RSB
   - 2 µl PhiX-Kontrolle
7. Fügen Sie dem dPhiX-Röhrchen 10 µl dHP3 hinzu.
8. Entsorgen Sie das dHP3-Röhrchen.
9. Mischen Sie das dPhiX-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
10. Denaturieren Sie dPhiX durch 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.
11. Mischen Sie HT1 mit dem Vortexmischer.
12. Fügen Sie dPhiX sofort 980 µl vorgekühltes HT1 hinzu.
13. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
14. Lagern Sie PhiX gekühlt, bis Sie es im Rahmen der Vorbereitung für die zweite Verdünnung benötigen. Die Endkonzentration beträgt 20 pM dPhiX.
15. Lagern Sie PhiX, HP3 und RSB wieder bei den entsprechenden Temperaturen ein.

Zusammenfassen und Denaturieren von Bibliotheken für TSO Comprehensive (EU)

1. Wenn die NL PCR-Platte gelagert wurde, tauen Sie sie auf Raumtemperatur auf. Zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei 280 × g.
2. Mischen Sie die Bibliotheken der NL PCR-Platte vorsichtig fünfmal mithilfe einer auf 30 µl eingestellten Mehrkanalpipette.
   Verwenden Sie für jede Bibliothek eine neue Spitze.

   ⚠ VORSICHT

   Mischen Sie Bibliotheken sorgfältig, um eine optimale Leistung zu ermöglichen.

3. Wählen Sie eine der folgenden Optionen, um die Bibliotheken in Pools zusammenzufassen, zu denaturieren und zu verdünnen.
   - **[Option 1]** Sie sequenzieren aus RNA- und DNA-Proben gewonnene Bibliotheken gleichzeitig. Siehe *Option 1: DNA- und RNA-Bibliotheken gemeinsam* auf Seite 81.
   - **[Option 2]** Sie sequenzieren ausschließlich aus DNA-Proben gewonnene Bibliotheken. Siehe *Option 2: nur DNA-Bibliotheken* auf Seite 82.
   - **[Option 3]** Sie sequenzieren ausschließlich aus RNA-Proben gewonnene Bibliotheken. Siehe *Option 3: Nur RNA-Bibliotheken* auf Seite 83.

Option 1: DNA- und RNA-Bibliotheken gemeinsam

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „PRL“ (gepoolte RNA-Bibliotheken).
2. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „PDL“ (gepoolte DNA-Bibliotheken).
3. Übertragen Sie 10 µl aus jeder normalisierten RNA (cDNA)-Bibliothek der NL-Platte in das PRL-Röhrchen. Fassen Sie nicht zwei Bibliotheken mit dem gleichen Index-Primer in einem Pool zusammen.
4. Übertragen Sie 10 µl aus jeder normalisierten DNA-Bibliothek der NL-Platte in das PDL-Röhrchen. Fassen Sie nicht zwei Bibliotheken mit dem gleichen Index-Primer in einem Pool zusammen.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der NL PCR-Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Mischen Sie das PRL- und PDL-Röhrchen mit dem Vortexmischer.
7. Zentrifugieren Sie die PRL- und PDL-Röhrchen kurz.
8. Inkubieren Sie die PRL- und PDL-Röhrchen in einem Hitzeblock 2 Minuten lang bei 96 °C.
9. Lagern Sie die PRL- und PDL-Röhrchen 5 Minuten lang kalt.
10. Mischen Sie die PRL- und PDL-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie sie anschließend kurz.
11. Lagern Sie die PRL- und PDL-Röhrchen kalt.

Vorbereiten der ersten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL1“ (Verdünnung 1).
2. Übertragen Sie 20 µl PDL in das leere DIL1-Röhrchen.
3. Geben Sie 5 µl PRL in das DIL1-Röhrchen.
4. Entsorgen Sie das PDL- und das PRL-Röhrchen.
5. Geben Sie 475 µl vorgekühltes HT1 in das DIL1-Röhrchen (Verdünnung 1:20).
6. Mischen Sie das DIL1-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

Vorbereiten der zweiten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL2“ (Verdünnung 2).

2. Übertragen Sie 40 µl DIL1 in das leere DIL2-Röhrchen.
3. Entsorgen Sie das DIL1-Röhrchen.
4. Geben Sie 1.660 µl vorgekühltes HT1 in das DIL2-Röhrchen (Verdünnung 1:850).
5. Mischen Sie das vorbereitete dPhiX (20 pM) mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
6. Geben Sie 2,5 µl vorbereitetes dPhiX (20 pM) in das DIL2-Röhrchen.
7. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
8. Laden Sie 1.300 µl DIL2 in die aufgetaute NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
   Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)*.
9. Entsorgen Sie das DIL2-Röhrchen.
10. Zentrifugieren Sie die NL PCR-Platte eine Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte anschließend bis zu 32 Tage lang zwischen -25 °C und -15 °C.
11. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort.
    Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)*.

Option 2: nur DNA-Bibliotheken

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „PDL“ (gepoolte DNA-Bibliotheken).
2. Übertragen Sie 10 µl aus jeder normalisierten DNA-Bibliothek der NL-Platte in das PDL-Röhrchen.
   Fassen Sie nicht zwei Bibliotheken mit dem gleichen Index-Primer in einem Pool zusammen.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der NL PCR-Platte an.
   Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
4. Mischen Sie das PDL-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie es anschließend kurz.
5. Inkubieren Sie das PDL-Röhrchen in einem Hitzeblock 2 Minuten lang bei 96 °C.
6. Lagern Sie das PDL-Röhrchen 5 Minuten lang kalt.
7. Mischen Sie das PDL-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie es anschließend kurz.
8. PRL-Röhrchen kalt lagern.

Vorbereiten der ersten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL1“ (Verdünnung 1).
2. Übertragen Sie 10 µl PDL in das leere DIL1-Röhrchen.
3. Entsorgen Sie das PDL-Röhrchen.
4. Geben Sie 190 µl vorgekühltes HT1 in das DIL1-Röhrchen (Verdünnung 1:20).
5. Mischen Sie das DIL1 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie es anschließend kurz.

Vorbereiten der zweiten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL2“ (Verdünnung 2).
2. Übertragen Sie 40 µl DIL1 in das leere DIL2-Röhrchen.
3. Entsorgen Sie das DIL1-Röhrchen.
4. Geben Sie 1.660 µl vorgekühltes HT1 in das DIL2-Röhrchen (Verdünnung 1:850).
5. Mischen Sie das vorbereitete dPhiX (20 pM) mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
6. Geben Sie 2,5 µl vorbereitetes dPhiX (20 pM) in das DIL2-Röhrchen.
7. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
8. Laden Sie 1.300 µl DIL2 in die aufgetaute NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
   Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)*.
9. Entsorgen Sie das DIL2-Röhrchen.
10. Zentrifugieren Sie die NL PCR-Platte eine Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte anschließend bis zu 32 Tage lang zwischen -25 °C und -15 °C.
11. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort.
    Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)*.

Option 3: Nur RNA-Bibliotheken

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „PRL“ (gepoolte RNA-Bibliotheken).
2. Übertragen Sie 10 µl aus jeder normalisierten RNA(cDNA)-Bibliothek der NL-Platte in das PRL-Röhrchen. Fassen Sie nicht zwei Bibliotheken mit dem gleichen Index-Primer in einem Pool zusammen.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der NL PCR-Platte an.
   Ränder und Wells vollständig versiegeln, um Verdunstung zu verhindern.
4. Mischen Sie das PRL-Röhrchen mit dem Vortexmischer.
5. Zentrifugieren Sie das PRL-Röhrchen kurz.
6. Inkubieren Sie das PRL-Röhrchen in einem Hitzeblock 2 Minuten lang bei 96 °C.
7. Lagern Sie das PRL-Röhrchen 5 Minuten lang kalt.
8. Mischen Sie das PRL-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie es anschließend kurz.
9. Lagern Sie das PRL-Röhrchen kalt.

Vorbereiten der ersten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL1“ (Verdünnung 1).
2. Übertragen Sie 10 µl PRL in das leere DIL1-Röhrchen.

3. Entsorgen Sie das PRL-Röhrchen.
4. Geben Sie 190 µl vorgekühltes HT1 in das DIL1-Röhrchen (Verdünnung 1:20).
5. Mischen Sie das DIL1 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie es anschließend kurz.

Vorbereiten der zweiten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL2“ (Verdünnung 2).
2. Übertragen Sie 40 µl DIL1 in das leere DIL2-Röhrchen.
3. Entsorgen Sie das DIL1-Röhrchen.
4. Geben Sie 1.646 µl vorgekühltes HT1 in das DIL2-Röhrchen (Verdünnung 1:843).
5. Mischen Sie das vorbereitete dPhiX (20 pM) mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
6. Geben Sie 16,7 µl vorbereitetes dPhiX (20 pM) in das DIL2-Röhrchen.
7. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
8. Laden Sie 1.300 µl DIL2 in die aufgetaute NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
   Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)*.
9. Entsorgen Sie das DIL2-Röhrchen.
10. Zentrifugieren Sie die NL PCR-Platte eine Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte bis zu 32 Tage lang zwischen -25 °C und -15 °C.
11. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort.
    Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)*.

Interpretation der Ergebnisse

Die Sequenzierungsergebnisse des TSO Comprehensive (EU)-Assays werden für jede Probe einzeln in einem PDF- und einem JSON-Bericht dokumentiert. Zusätzlich wird auf Probenebene ein Bericht über geringe Tiefe erstellt (`LowDepthReport.tsv`).

Die folgenden Ausgabedateien werden auf Laufebene erstellt:

- `ControlOutput.tsv`
- `MetricsOutput.tsv`

In den PDF- und JSON-Berichten werden nur Varianten aufgeführt, die die Qualitätskontrolle bestehen.

Ausführliche Informationen zur Analyse finden Sie in *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)*.

Ergebnisse der Begleitdiagnostik

Für jede bestimmungsgemäße Verwendung der Begleitdiagnostik (CDx) gibt es drei mögliche Ergebnisse:

- **Positiv:** Eine Variante oder ein Biomarker wurde erkannt und als Stufe 1 (CDx) klassifiziert.
- **Nicht erkannt:** Es wurden bei bestimmungsgemäßer Verwendung der CDx keine Varianten oder Biomarker in der Probe erkannt. Der für die Probe ausgewählte Tumortyp ist für die CDx geeignet.
- **Kein Ergebnis:** Eine Bestimmung des Variantenstatus ist aus mindestens einem der folgenden Gründe nicht möglich:
  - Der Verwendungszweck der CDx ist für die getestete Probe nicht geeignet, da der für die Probe ausgewählte Tumortyp nicht dem Tumortyp der CDx entspricht.
  - Der Sequenzierungslauf entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle.
  - Die Bibliothek entspricht nicht den erforderlichen Spezifikationen der Qualitätskontrolle.
  - Die entsprechende Nukleinsäure wurde nicht im Lauf verarbeitet.

Alle Ergebnisse der bestimmungsgemäßen Verwendung der CDx werden im Abschnitt mit den Ergebnissen der Begleitdiagnostik des JSON-Berichts aufgeführt. Im Abschnitt mit den Ergebnissen der Begleitdiagnostik des PDF-Berichts werden nur die bestimmungsgemäßen Verwendungen mit positivem Ergebnis aufgeführt.

Tumor-Profiling-Varianten

TSO Comprehensive (EU) führt somatische Varianten in Berichten zu Varianten mit nachgewiesener klinischer Signifikanz oder Varianten mit potenzieller klinischer Signifikanz auf. Die TSO Comprehensive (EU)-Assay-Software bestimmt mithilfe einer KB auf Grundlage von Evidenz therapeutischer, diagnostischer oder prognostischer Assoziationen, ob die jeweilige erkannte und geeignete Variante (Tabelle 2) klinisch signifikant oder potenziell klinisch signifikant ist. Die KB berücksichtigt weiterhin, ob Assoziationen im getesteten Tumortyp nachgewiesen werden konnten. Die Anfälligkeit oder das Krebsrisiko betreffende Assoziationen sind in der KB nicht enthalten. Häufige Polymorphismen werden entfernt.

Für Tumor-Profiling-Varianten werden positive Ergebnisse anhand der installierten KB und des ermittelten Tumortyps in Genomische Befunde mit nachgewiesener klinischer Signifikanz (Stufe 2) oder genomische Befunde mit potenzieller klinischer Signifikanz (Stufe 3) klassifiziert.

Bei Fehlern während der Qualitätskontrolle werden keine Ergebnisse für die Variantentypen ausgegeben, die für die fehlgeschlagene Qualitätskontrollmetrik relevant sind. Weitere Informationen finden Sie in Tabelle 40 und Tabelle 41. Tumor-Profiling-Positionen mit unzureichender Tiefe werden im Bericht über geringe Tiefe und nicht im TSO Comprehensive (EU)-Bericht aufgeführt.

Qualitätssicherung

- Quantifizierungsinformationen für Nukleinsäuren und Angaben zu den mindestens erforderlichen Zugabematerialien finden Sie unter *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28.
- Die Validität von Sequenzierungsläufen und Proben wird vom TSO Comprehensive-Analysemodul (EU) automatisch ermittelt und in einem Bericht ausgegeben. Ausführliche Informationen zur Analyse finden Sie in *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)*.
- Der TSO Comprehensive (EU)-Bericht, der im PDF- und JSON-Format verfügbar ist, fasst die Ergebnisse der Qualitätskontrolle zusammen. Die Berichtsdateien finden Sie im Analyseordner. Siehe *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)* für den Speicherort des Analyseordners (enthält PDF- und JSON-Berichte) und des Laufordners.

Tabelle 40 Ergebnis-Qualitätskontrollmetriken im TSO Comprehensive (EU)-Bericht

Ausgabetyp	Metrik	Spezifikation	Beschreibung	Auswirkungen der Nichteinhaltung der Spezifikationen*
Sequenzierungslauf	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Prozentsatz der Reads nach Filterung (PF).	Sequenzierungslauf ungültig. Für keine Probe im Lauf wurden Ergebnisse berichtet.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Durchschnittlicher Prozentsatz der Base-Calls mit einem Qualitäts-Score von Q30 oder höher für Read 1.	Sequenzierungslauf ungültig. Für keine Probe im Lauf wurden Ergebnisse berichtet.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Durchschnittlicher Prozentsatz der Base-Calls mit einem Qualitäts-Score von Q30 oder höher für Read 2.	

Ausgabetyp	Metrik	Spezifikation	Beschreibung	Auswirkungen der Nichteinhaltung der Spezifikationen*
DNA-Bibliotheken	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3.106 ODER > 3.106 und P-WERT ≤ 0,049	Eine Metrik zur Bewertung der Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen mithilfe der Variantenallelfrequenz (VAF) häufiger Varianten. Der Kontaminations-Score basiert auf der Verteilung der VAF der SNPs. Der Kontaminations-P-Wert wird zur Bewertung stark umgestalteter Genome verwendet. Er ist nur anwendbar, wenn der Kontaminationswert über dem oberen Spezifikationsgrenzwert liegt.	Keine DNA-Ergebnisse im Bericht.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Die mittlere Fragmentlänge der Probe.	Keine Ergebnisse für TMB oder kleine DNA-Varianten im Bericht.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (Anzahl)	≥ 150	Mittlere Exon-Fragment-Coverage aller Exon-Basen.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Prozentsatz der Exonbasen mit 50-facher Fragment-Coverage.	

Ausgabetyp	Metrik	Spezifikation	Beschreibung	Auswirkungen der Nichteinhaltung der Spezifikationen*
	USABLE_MSI_SITES (Anzahl)	≥ 40	Die Anzahl der MSI-Loci, die für das MSI-Calling verwendet werden können (Anzahl der Mikrosatelliten-Loci mit ausreichend übergreifenden Reads zur Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität).	Keine MSI-Ergebnisse im Bericht.
	COVERAGE_MAD (Anzahl)	≤ 0,210	Der Mittelwert der absoluten Abweichungen vom Mittelwert der normalisierten Anzahl den einzelnen CNV-Zielregionen.	Keine Ergebnisse für die Genamplifikation im Bericht.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (Anzahl)	≥ 1,0	Mittlerer Rohwert der Klassenanzahl pro CNV-Target.	
RNA-Bibliotheken	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Die mittlere Fragmentlänge der Probe.	Keine Ergebnisse für Fusionen oder Spleißvarianten im Bericht.

Ausgabetyp	Metrik	Spezifikation	Beschreibung	Auswirkungen der Nichteinhaltung der Spezifikationen*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (Koeffizient)	≤ 0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X gibt die Einheitlichkeit der Coverage an. Für jedes Gen mit mindestens 500-facher Coverage wird der Variationskoeffizient der Coverage des gesamten Genbestands berechnet. Diese Metrik gibt den Mittelwert dieser Werte an. Ein hoher Wert bezeichnet eine hohe Abweichung und weist auf ein Problem bei der Bibliotheksvorbereitung hin, z. B. eine zu geringe Probenzugabe und/oder Probleme beim Sonden-Pulldown. Diese Metrik wird anhand sämtlicher Reads berechnet, einschließlich als Dubletten gekennzeichneter Reads.	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (Anzahl)	≥ 9.000.000	Die Gesamtzahl der Reads, die den Zielregionen zugeordnet sind. Diese Metrik wird anhand sämtlicher Reads berechnet, einschließlich als Dubletten gekennzeichneter Reads.	

* Für gültige Ergebnisse wird PASS (BESTANDEN) angezeigt.

Tabelle 41 Ergebnis-Kontrollmetriken im TSO Comprehensive (EU)-Bericht

Ausgabetyp	Metrik	Spezifikation	Auswirkungen der Nichteinhaltung der Spezifikationen*
Positive Kontrollprobe	DNA Externe Kontrolle	23 von 24 spezifizierten Varianten erkannt	Patientenproben müssen auf Grundlage von Kontrollprobenergebnissen manuell für ungültig erklärt werden. Die Analysemodulsoftware erklärt Patientenproben nicht automatisch aufgrund von Kontrollprobenergebnissen für ungültig.
	RNA Externe Kontrolle	12 von 13 spezifizierten Varianten erkannt	
Negative Kontrollprobe	DNA Mittlere Exon-Coverage für TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Patientenproben müssen auf Grundlage von Kontrollprobenergebnissen manuell für ungültig erklärt werden. Die Analysemodulsoftware erklärt Patientenproben nicht automatisch aufgrund von Kontrollprobenergebnissen für ungültig.
	RNA-Gen über mittlerem Grenzwert	≤ 1	

* Für gültige Ergebnisse wird PASS (BESTANDEN) angezeigt.

- Wiederholen Sie ungültige Sequenzierungsläufe.
- Wiederholen Sie Bibliothekstests in folgenden Fällen:
  - DNA-Bibliotheken kontaminiert
  - RNA-Bibliotheken ungültig
  - Wenn DNA-Bibliotheken nur für einen und nicht für alle Variantentypen für ungültig erklärt wurden, können Tests wiederholt werden, um weitere Ergebnisse für Varianten oder Biomarker zu erhalten.
- Beim Varianten-Calling werden positive Kontrollproben geprüft. Wenn positive Kontrollproben nicht den Spezifikationen für das Varianten-Calling entsprechen, erklären Sie den Sequenzierungslauf manuell für ungültig. Die Analysemodulsoftware erklärt Patientenproben nicht automatisch aufgrund von Kontrollprobenergebnissen für ungültig.
- NTCs werden hinsichtlich des Medians der Exon-Coverage für DNA und hinsichtlich der Gene oberhalb des Medians des Schwellenwerts für RNA geprüft. Machen Sie die Bibliotheksvorbereitung und alle zugehörigen Sequenzierungsläufe manuell ungültig, wenn Negativkontrollproben die Spezifikationen nicht erfüllen. Die Analysemodulsoftware erklärt Patientenproben nicht automatisch aufgrund von Kontrollprobenergebnissen für ungültig.
- Führen Sie weitere Qualitätskontrollen in Übereinstimmung mit den örtlichen und/oder landesweiten Vorschriften oder Zulassungsanforderungen durch.

Weitere Informationen zur Wiederholung von Sequenzierungsläufen oder Tests von Bibliotheken finden Sie unter *Fehlerbehebung* auf Seite 91.

Fehlerbehebung

In der folgenden Tabelle finden Sie Hinweise zur Behebung von Fehlern im Workflow. Wenn ein Sequenzierungslauf oder eine Bibliotheksvorbereitung für eine Probe zweimal fehlschlägt, sind möglicherweise weitere Schritte zur Fehlerbehebung erforderlich. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Der Sequenzierungslauf entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle.	• Pooling-Fehler • Verdünnungsfehler • Unvollständige Hitzedenaturierung von PRL/PDL • Probleme bei der Vorbereitung von Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien (z. B. nicht ausreichend aufgetaut, Kondensation/Fremdkörper auf Durchflusszelle)	• Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der normalisierten Bibliotheken (NL). Weitere Informationen finden Sie unter *Vorbereitung für die Sequenzierung* auf Seite 79.
	• Falsche Verwendung von Anreicherungssonden (z. B. OPR1-Sonden für DNA-Proben, OPD2-Sonden für RNA-Proben) • Fehler im Bibliotheksvorbereitungs-Workflow während oder nach dem ersten Hybridisierungsschritt.	Reichern Sie die Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der amplifizierten Bibliotheksproben (ALS) an. Weitere Informationen finden Sie unter *Konfiguration der ersten Hybridisierung* auf Seite 61.
	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe wurden nicht erfüllt.	Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Weitere Informationen finden Sie unter *Denaturierung und Annealing der RNA* auf Seite 45 oder *Fragmentierung der gDNA* auf Seite 51.
	Fehler im Bibliotheksvorbereitungs-Workflow während oder vor dem Index-PCR-Schritt	Reichern Sie die Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der amplifizierten Bibliotheksproben (ALS) an. Weitere Informationen finden Sie unter *Konfiguration der ersten Hybridisierung* auf Seite 61.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Geräteproblem	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Fehler bei der Berichterstellung oder allgemeiner Gerätefehler (z. B. Netzwerkfehler, Fehler beim Laden/Entladen der Reagenzien usw.)	Software- oder Geräteproblem.	Siehe Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661) für Hinweise zur Berichterstellung. Weitere Unterstützung erhalten Sie vom technischen Support von Illumina.
Die DNA-Bibliothek entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle.	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe wurden nicht erfüllt.	Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe sicher und wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab dem Schritt „Fragmentierung der gDNA“. Weitere Informationen finden Sie unter *Probenanforderungen* auf Seite 27 und *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler im Assay-Workflow	Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase der vermutete Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina. • Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der normalisierten Bibliotheken (NL). Weitere Informationen finden Sie unter *Vorbereitung für die Sequenzierung* auf Seite 79. • Reichern Sie die Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der amplifizierten Bibliotheksproben (ALS) an. Weitere Informationen finden Sie unter *Konfiguration der ersten Hybridisierung* auf Seite 61. • Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Weitere Informationen finden Sie unter *Fragmentierung der gDNA* auf Seite 51.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Die Kriterien für CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE werden nicht erfüllt.	Beachten Sie die Informationen unter „Warn- und Vorsichtshinweise“ zur Vermeidung von Kreuzkontaminierung. Überprüfen Sie das Plattenlayout sowie die Bibliotheksindizierung und stellen Sie sicher, dass Bibliotheken mit dem gleichen Index nicht gemeinsam sequenziert wurden. Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung für betroffene Bibliotheken ab dem Start des Workflows. Weitere Informationen finden Sie unter *Fragmentierung der gDNA* auf Seite 51. Die Kontaminierung hat möglicherweise während der Probenextraktion stattgefunden. Unter Umständen muss die Extraktion wiederholt werden, um zu gewährleisten, dass die Probe nicht kontaminiert ist.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Keine verwendbare MSI.	Gehen Sie die Informationen des Herstellers des Ultraschall-Sonicators zu Verwendung und Betrieb (einschließlich Wassermenge und Röhrchentyp) durch. Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe in den Assay sicher. Weitere Informationen finden Sie unter *Probenanforderungen* auf Seite 27 und *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28. Wenn die Probe übermäßig fragmentiert oder fehlerhaft ist, ist möglicherweise eine erneute Probenextraktion und/oder die Wiederholung des Schritts „Fragmentierung der gDNA“ erforderlich.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Die Probe kann übermäßig fragmentiert sein oder fehlerhafte Nukleinsäure enthalten, wodurch möglicherweise nicht ausreichend eindeutige Bibliotheken erstellt werden können.	Überprüfen Sie die *Konfigurationseinstellungen für das Ultraschallgerät zur DNA-Fragmentierung* auf Seite 23 und die Informationen des Herstellers des Ultraschallgeräts zu Verwendung und Betrieb (einschließlich Wassermenge und Röhrchentyp). Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe in den Assay sicher. Weitere Informationen finden Sie unter *Probenanforderungen* auf Seite 27 und *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28. Wenn die Probe übermäßig fragmentiert oder fehlerhaft ist, ist möglicherweise eine erneute Probenextraktion und/oder die Wiederholung des Schritts „Fragmentierung der gDNA“ erforderlich.
Die RNA-Bibliothek entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle.	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe wurden nicht erfüllt.	Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe sicher und wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab dem Schritt „Denaturierung und Annealing von RNA“. Weitere Informationen finden Sie unter *Probenanforderungen* auf Seite 27 und *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler im Assay-Workflow	Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase der vermutete Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina. • Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der normalisierten Bibliotheken (NL). Weitere Informationen finden Sie unter *Vorbereitung für die Sequenzierung* auf Seite 79. • Reichern Sie die Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der amplifizierten Bibliotheksproben (ALS) an. Weitere Informationen finden Sie unter *Konfiguration der ersten Hybridisierung* auf Seite 61. • Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Weitere Informationen finden Sie unter *Denaturierung und Annealing der RNA* auf Seite 45.
	Die Probe kann übermäßig fragmentiert sein oder fehlerhafte Nukleinsäure enthalten, wodurch möglicherweise nicht ausreichend eindeutige Bibliotheken erstellt werden können.	Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe sicher. Weitere Informationen finden Sie unter *Probenanforderungen* auf Seite 27 und *Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren* auf Seite 28. Wenn die Probe übermäßig fragmentiert oder fehlerhaft ist, ist möglicherweise eine erneute Probenextraktion erforderlich.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Fehlschlagen der positiven Kontrollprobe (DNA/RNA).	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe an die positive Kontrollprobe wurden nicht erfüllt.	Stellen Sie die ordnungsgemäße Zugabe in den Assay sicher. Prüfen Sie das Plattenlayout und stellen Sie sicher, dass sich die jeweiligen Reagenzien (Proben, Indizes) in den entsprechenden Wells befinden. Stellen Sie eine Lagerung der positiven Kontrollprobe entsprechend dem Etikett sicher. Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung aller Proben mit dieser positiven Kontrollprobe ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase der vermutete Bediener- oder Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina. • Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der normalisierten Bibliotheken (NL). Weitere Informationen finden Sie unter *Vorbereitung für die Sequenzierung* auf Seite 79. • Reichern Sie die Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der amplifizierten Bibliotheksproben (ALS) an. Weitere Informationen finden Sie unter *Konfiguration der ersten Hybridisierung* auf Seite 61. • Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Weitere Informationen finden Sie unter *Denaturierung und Annealing der RNA* auf Seite 45 oder *Fragmentierung der gDNA* auf Seite 51.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler im Assay-Workflow	
NTC-Fehler (DNA/RNA).	Es liegt eine Kreuzkontaminierung oder eine Kontaminierung des Arbeitsbereichs vor.	Beachten Sie die Informationen unter „Warn- und Vorsichtshinweise“ zur Dekontaminierung der Arbeitsbereiche und zur Vermeidung einer Kreuzkontaminierung. Überprüfen Sie das Plattenlayout sowie die Bibliotheksindizierung und stellen Sie sicher, dass Bibliotheken mit dem gleichen Index nicht gemeinsam sequenziert wurden. Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung aller Bibliotheken mit der gleichen negativen Kontrollprobe ab dem Beginn des Workflows.
	Fehlerhafte Indizierung der Bibliothek.	
Software zeigt an, dass Positiv und/oder Negativkontrollproben nicht in den Sequenzierungslauf einbezogen wurden.	Falsche Zuordnung des Krebstyps in der Local Run Manager-Laufplanung.	Wiederholen Sie die Analyse mit korrekt angegebenen Kontrollproben wie in der Workflow-Anleitung des Analysemoduls erläutert (siehe *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)*).

Leistungsmerkmale

TSO Comprehensive (EU) ist ein gezieltes NGS-Panel, das Veränderungen in 517 Genen nachweist. Kleine DNA-Varianten (Einzelnukleotid-Varianten [SNVs], Mehrfachnukleotid-Varianten [MNVs], Insertionen und Deletionen) können für alle 517 Gene in Berichte aufgenommen werden. Die Tumor-Mutationslast wird als Score angegeben, der auf der Anzahl der nicht treibenden somatischen Varianten pro Megabase basiert (siehe *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow-Anleitung (Dokument-Nr. 200008661)* für Einzelheiten). MSI wird als Status gemeldet. Genamplifikationen aus den MET- und ERBB2-Genen können in Berichten aufgeführt werden. Fusionen können anhand der 23 Gene gemeldet werden, die in der *Zusammenfassung und Erläuterung des Assays* auf Seite 1 angegeben sind. Spleißvarianten aus den MET- und EGFR-Genen können in Berichte aufgenommen werden. Um in Berichten aufgeführt zu werden,

müssen Varianten in der TSO Comprehensive (EU)-Assay-KB erkannt sowie als relevant klassifiziert werden und auf Grundlage des getesteten Gewebetyps geeignet sein. Um in Berichten aufgeführt zu werden, benötigen NTRK-Fusionen 5'-Fusionspartner und die NTRK-Kinasedomäne muss intakt sein.

Für kleine DNA-Varianten wurde ein repräsentativer Ansatz zur Validierung der untersuchten Gene im Panel mit Daten zu SNVs, MNVs, Insertionen und Deletionen durchgeführt. Für Genamplifikationen, Fusionen und Spleißvarianten wurden Tests auf Genebene durchgeführt. Die TMB und die MSI wurden, wo angegeben, ausgewertet. Für den NTRK-CDx-Claim werden Fusionen in FFPE-Proben in Studien getestet, die auf die Claim-spezifische Leistung fokussiert sind (wie die Nachweisgrenze, Präzision innerhalb des Labors, Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und klinische Performance).

Tabelle 42 enthält die Definitionen der in den unterschiedlichen Studien berechneten Metriken.

Tabelle 42 Definitionen der Metriken

Laufzeit	Definition
Übereinstimmung positiver Ergebnisse in Prozent (PPA)	Der Prozentsatz der korrekt erkannten positiven Ergebnisse im Verhältnis zu den gesamten positiven Ergebnissen bei einer orthogonalen Methode.
Übereinstimmung negativer Ergebnisse in Prozent (NPA)	Der Prozentsatz der korrekt erkannten negativen Ergebnisse im Verhältnis zu den gesamten negativen Ergebnissen bei einer orthogonalen Methode.
Gesamtübereinstimmung in Prozent (OPA)	Der Prozentsatz der korrekt erkannten positiven und negativen Ergebnisse im Verhältnis zu den gesamten Beobachtungen bei einer orthogonalen Methode.
Prozentsatz positiver Call (PPC)	Prozentualer Anteil der Beobachtungen mit positivem Ergebnis für ein Ziel an den Beobachtungen, für die ein positives Ergebnis für das Ziel zu erwarten ist.
Prozentsatz negativer Calls (PNC)	Prozentualer Anteil der Beobachtungen mit negativem Ergebnis für ein Ziel an den Beobachtungen, für die ein negatives Ergebnis für das Ziel zu erwarten ist.
n/N	Die Anzahl der positiven oder negativen Beobachtungen (n) geteilt durch die Gesamtzahl der Beobachtungen (N) zur Berechnung des PPC bzw. PNC. Die Werte von n und N können auf verschiedenen Ebenen liegen (z. B. Variante oder Gen) oder über eine Gruppe hinweg kombiniert werden (z. B. SNVs).
Standardabweichung (SD)	Ein Maß für die Streuung der Werte einer Variablen um ihren Mittelwert.
Variationskoeffizient in Prozent (%CV)	Standardabweichung geteilt durch den Mittelwert in Prozent.

Kreuzkontaminierung

Die Kreuzkontaminierung wurde untersucht, um festzustellen, ob falsch positive Ergebnisse aufgrund Well-zu-Well-Kontaminierung während der Vorbereitung der Probenbibliothek oder durch eine Lauf-zu-Lauf-Kontaminierung zwischen aufeinanderfolgenden Sequenzierungsläufen auftreten. Diese Analyse

wurde für kleine DNA-Varianten (die auch TMB beeinflussen), Fusionen, Genamplifikationen und MSI durchgeführt. Die Bibliotheken wurden aus charakterisierten Proben in Schachbrettanordnung mit wechselnden Proben zur Untersuchung der Well-zu-Well-Kontaminierung und mit wechselnden Indizes zur Untersuchung von Kontaminierungen bei aufeinanderfolgenden Sequenzierungsläufen (Lauf zu Lauf) auf dem gleichen NextSeq 550Dx-Gerät vorbereitet. Die Untersuchung der Kreuzkontaminierung zeigte bei Untersuchung der erkannten Varianten in jeder Probe keine Kontaminierungsvorfälle und keine falsch positiven Ergebnisse.

Für den TSO Comprehensive (EU)-Assay wurden zwei QC-Metriken (CONTAMINATION_SCORE und P_VALUE) entwickelt, um eine Probenkontamination in DNA-Proben nachzuweisen. Die Sensitivität des Kontaminationsnachweises wurde untersucht. FFPE-Tumor-DNA-Proben wurden mit unterschiedlichen Mengen an normalen FFPE-DNA-Proben gemischt, um gezielt kontaminierte Proben zu erstellen.

Insgesamt wurden 1.112 Kontaminationsbeobachtungen generiert, und bei 95 % (1.054) der Beobachtungen wurde eine Kontamination festgestellt. Die Nachweisrate wurde auf 96 % (939/976) erhöht, wenn der Anteil der Kontamination zwischen 10 % und 90 % (Masse/Masse) lag. Von den 37 Beobachtungen zwischen 10 % und 90 % Kontamination, bei denen keine Kontamination nachgewiesen wurde, erfüllten 12 nicht die Coverage-Spezifikation für das Calling kleiner DNA-Varianten. Eine geringe Coverage behindert den Nachweis von Kontaminationen, jedoch werden keine kleinen DNA-Varianten gemeldet, wodurch die Auswirkungen einer Kontamination abgeschwächt werden. Fünfzehn Beobachtungen entsprachen nicht der Spezifikation für Genamplifikationen (mittlerer Klassenzählwert für die QC-Metrik), um die Genamplifikation zu benennen. Für die Proben würde kein Ergebnis für die Genamplifikation berichtet.

Die Studie hat gezeigt, dass bei dem TSO Comprehensive (EU)-Assay nur ein geringes Auftreten von Well-zu-Well- oder Lauf-zu-Lauf-Kreuzkontaminationen zu erwarten ist. Zusammen mit den Kontaminationsmetriken in der Software mindern diese Ergebnisse das Risiko falscher Variantenergebnisse aufgrund einer Probenkontamination.

Bewertung des Kits zur Extraktion der Nukleinsäuren

Drei im Handel erhältliche DNA- und RNA-Extraktionskits wurden mit TSO Comprehensive (EU) bewertet. Mit den drei Extraktionskits wurden sowohl DNA als auch RNA aus denselben FFPE-Gewebeschnitten isoliert. Die Kits verwendeten unterschiedliche Entparaffinierungsmittel und Nukleinsäurebindungsschritte (Tabelle 43). Vornehmlich wurde Kit 1 zur Bestimmung der TSO Comprehensive (EU)-Leistung verwendet.

Tabelle 43 Kit-Eigenschaften

Kit	Entparaffinierungsmittel	Nukleinsäurebindung
1	Proprietär	Spalte
2	Xylen	Spalte
3	Mineralöl	Magnetische Beads

Tabelle 44 und Tabelle 45 fassen die Auswirkungen der Extraktionskits auf die Validität der Bibliothek und das Varianten-Calling zusammen. Wenn sich die Mittelwerte der Extraktionskits signifikant unterschieden, wurde dieser Unterschied angegeben. Die mittleren Unterschiede zwischen den Extraktionskits wurden mit Kit 1 als Kontrolle berechnet, da Kit 1 zur Extraktion der meisten Nukleinsäuren verwendet wurde, die für TSO

Comprehensive (EU) analytische Studien verwendet wurden. Der mittlere Unterschied im Vergleich zu Kit 1 wurde berichtet, um zu veranschaulichen, wie sich verschiedene Extraktionskits auf die anderen TSO Comprehensive (EU) analytischen Studien auswirken würden.

Tabelle 44 Auswirkungen der Extraktionskits auf die Validität der Bibliothek

Variantentyp	QC-Metriken für die Bibliothek	Mittlere Differenz im Vergleich zu Kit 1
Kleine DNA-Varianten/TMB	Mittlere Exon-Coverage (Forts.) PCT Exon 50X (%) Mittlere Insert-Größe (bp)	Kit 2 um 56 Reads niedriger Kit 3 um 0,298 % höher Kit 2 und Kit 3 um 3 bp niedriger
DNA MSI	Verwendbare MSI-Loci	Kit 3 um 8 Loci höher
DNA-Genamplifikationen	Coverage MAD (Anzahl)	Kit 2 um 0,0043 niedriger
	Mediane Klassenzählwert	Kit 2 um 0,5825 niedriger, Kit 3 um 0,3086 höher
RNA (Fusionen/Spleißvarianten)	Mittlere Insert-Größe (bp) Protokoll (Median CV Gene500X) Summe der Target-Reads	Kit 3 um 2 bp höher Kit 2 um 0,029 höher Kein signifikanter Unterschied

Es wurde beobachtet, dass Extraktionskits 2 und 3 mehr bestätigende Reads aufweisen, sodass Fusionen und Spleißvarianten in der Nähe der LoD aufgrund der Auswahl des Extraktionskits eine höhere Erkennungswahrscheinlichkeit aufweisen.

Tabelle 45 Auswirkungen der Extraktionskits auf das Varianten-Calling

Variantentyp (Einheiten)	Varianten-Calling (mittlere Differenz im Vergleich zu Kit 1)
Kleine DNA-Varianten (VAF)	Technisch nicht signifikant Target-Varianten: Die Varianz zwischen den Kits war im Verhältnis zum Rest gering Nicht-Target-Varianten: Keine signifikanten Unterschiede für die ersten beiden VAF-Klassen. Keine Unterschiede von Bedeutung, wenn die statistische Signifikanz berücksichtigt wird.
TMB (Mutation pro Megabase)	Technisch nicht signifikant; die Varianz zwischen den Kits war im Verhältnis zum Rest gering.
MSI (% instabile Loci)	Kit 3 mit 1,9 % instabilen Loci weniger
Genamplifikation (Fold-Change)	Kit 2 (0,06) und Kit 3 (0,08) mit höherem Fold-Change
Fusionen (bestätigende Reads)	Kit 2 hatte 51 % und Kit 3 hatte 23 % mehr bestätigende Reads
Spleißvarianten (bestätigende Reads)	Kit 2 und Kit 3 hatten 48 % mehr bestätigende Reads

Störende Substanzen

Die Auswirkungen potenzieller endogener und exogener Substanzen auf die Leistung des TSO Comprehensive (EU)-Assays wurden bewertet. Körpereigene Substanzen (Melanin und Hämoglobin) wurden den Proben während der Nukleinsäureextraktion zugesetzt. Körperfremde Substanzen (Ethanol, Xylol und Proteinase K) waren während der Nukleinsäureextraktion vorhanden und wurden der gereinigten Nukleinsäure zudem vor der Bibliotheksvorbereitung zugesetzt. Wo Interferenzen mit zugesetzter Proteinase K beobachtet wurden, wurden auch erhöhte Konzentrationen von Proteinase K während des Extraktionsprozesses bewertet. Während der Bibliotheksvorbereitung wurden überschüssige Indexprimer (15 % und 30 %) hinzugefügt. Mit Ausnahme von Index-Primern wurden zu FFPE-Proben aus Gehirn, Brust, Dickdarm, Lunge, medullärer Schilddrüse, NSCLC, Ovarial-, Prostata-, Speichel-, Haut-, Weichgewebe- und Schilddrüsengewebe hinzugefügt – acht Proben wurden für die DNA-Analyse und 13 für die RNA-Analyse extrahiert. Für Index-Primer wurden sechs FFPE-Proben aus drei verschiedenen Gewebetypen (Schilddrüse, Blase, Dickdarm) für die DNA-Analyse und fünf FFPE-Proben aus vier verschiedenen Gewebetypen (Lunge, Schilddrüse, Dickdarm, Brust) für die RNA-Analyse verwendet. Für jede der 16 einzigartigen Proben gab es eine endogene Kontrolle ohne Zusätze und eine exogene Kontrolle mit Puffer oder Wasser. Die Auswirkung von Nekrose wurde anhand einer weiteren Gruppe von acht FFPE-Proben aus Gehirn- Dickdarm- und Lungengewebe untersucht. Für jede Nekroseprobe war eine makrodissezierte Kontrollprobe ohne Nekrose vorhanden. Für alle Störfaktoren wurden vier Replikate pro Probe mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay getestet und mit den entsprechenden Kontrollbedingungen für kleine DNA-Varianten, Genamplifikationen, RNA-Fusionen und RNA-Spleißvarianten sowie für MSI-Status und TMB-Score verglichen. Es wurden sowohl CDx- als auch Tumorprofilierungsvarianten eingeschlossen.

Nachweis von DNA-Varianten

Melanin (0,2 µg/ml), Hämoglobin (2 mg/ml), Ethanol (5 %), Proteinase K (0,04 mg/ml in Nukleinsäure) und Xylol (0,0001 %) wirken sich nicht auf die Bestimmung von TMB-Score und MSI-Status sowie den Nachweis von kleinen DNA-Varianten und Genamplifikationen aus.

Nachweis von RNA-Varianten

Die Daten legen nahe, dass Melanin (0,2 µg/ml), Ethanol (5 %) und Xylol (0,0001 %) die RNA-Fusionen oder -Spleißvarianten nicht beeinflussten. Hämoglobin (2 mg/ml) beeinträchtigte (reduzierte bestätigende Reads) mit drei verschiedenen Spleißvarianten im MET-Gen. Eine Spleißvariante im AR-Gen (drei verschiedene Proben) und eine im EGFR-Gen (eine Probe) waren nicht betroffen. Wenn das Labor RNA mit dem Assay analysiert, sollte Gewebe mit Hämoglobin vermieden oder minimiert werden, wenn Schnitte aus dem Gewebeblock entnommen werden.

Proteinase K (0,04 mg/ml in Nukleinsäure) beeinträchtigte RNA-Fusionen und Spleißvarianten. Proteinase K wurde während des Extraktionsprozesses mit 2,6 mg/ml und 5,2 mg/ml getestet, was dem 2- und 4-Fachen der Standardkonzentration in einem handelsüblichen Kit entspricht. Fusionen wurden bei 4-facher, aber nicht bei 2-facher Proteinase K gehemmt. Spleißvarianten wurden bei 2-facher Proteinase K gehemmt. Proteinase K oder gleichwertige Enzyme sollten während der Extraktion nicht über die Standardkonzentration erhöht werden, die in einem Extraktionskit bereitgestellt wird.

Spleißvarianten, die Reads unterstützen, nehmen mit 30 % überschüssigen Indexprimern ab, jedoch nicht mit 15 % Überschuss.

Nekrose

Das Vorhandensein von nekrotischem Gewebe (bis zu 70 %) wirkte sich nicht auf die Bestimmung von TMB-Score und MSI-Status sowie kleinen DNA-Varianten aus. RNA-Varianten (bestätigende Reads) und Genamplifikationsdetektion (Fold-Change) waren in Proben mit ≥ 25 % und ≥ 23 % nekrotischem Gehalt im Gewebebereich (nach Fläche) reduziert. Enthält der Probenschnitt ≥ 23 % nekrotisches Gewebe in der gesamten Gewebefläche, muss das nekrotische Gewebe durch eine Makrodisektion entfernt werden.

Stabilität

Echtzeitstabilität

Die Haltbarkeit des TSO Comprehensive (EU)-Assay-Kits wurde anhand der tatsächlichen Stabilität bei Lagerung gemäß Produktkennzeichnung ermittelt. Die Studie wurde auf Grundlage von Tests für drei Reagenzienchargen entwickelt und orientierte sich an der klassischen Stabilitätsuntersuchungen gemäß der Richtlinie CLSI EP25-A. Die Kits wurden für die Dauer der Untersuchung in der endgültigen Kit-Konfiguration gelagert. Die Lagerbedingungen entsprachen der Produktkennzeichnung. Gefrorene Kit-Komponenten wurden bei -15 °C bis -25 °C gelagert. Gekühlte Kit-Komponenten wurden bei 2 °C bis 8 °C gelagert.

Die Kits wurden zu festgelegten Zeitpunkten auf Aussehen und funktionelle Freigabekriterien getestet. Darüber hinaus wurden für das QC-Kontrollprobenmaterial die Trends in Bezug auf Varianten-Calling- und Proben-QC-Metriken analysiert. Die Haltbarkeit wurde für jedes Reagenz ermittelt. Verfallsdaten werden auf Grundlage von Herstellungsdatum und Haltbarkeit berechnet. Verfallsdaten für Kits richten sich nach dem frühesten Verfallsdatum eines der Reagenzien.

Anbruchstabilität der Kits

Die Anbruchstabilität des TSO Comprehensive (EU)-Assay-Kits wurde unter normalen Anwendungsbedingungen über die gesamte Haltbarkeitsdauer für mehrere Anwendungen des Kits untersucht. Das Reagenzien-Kit wurde mehrfach eingefroren und aufgetaut und für bis zu vier Verwendungen getestet. Zusätzlich wurden acht RNA- und acht DNA-Bibliotheken insgesamt dreimal vorbereitet, um die maximale Anzahl unterstützter Bibliotheken (pro Kit 24 DNA- und 24 RNA-Bibliotheken) zu testen. Alle Kriterien zur Freigabe funktionaler Kits wurden für alle getesteten Einfrier- und Auftauzyklen sowie Zeitpunkte erfüllt. Es wurden FFPE-Proben mit mindestens ≥ 25 Monate alten Reagenzien getestet, um die Auswirkungen der Verwendung von angebrochenen Produkten auf das Varianten-Calling zu ermitteln. Eine qualitative Analyse der untersuchten Varianten zeigte, dass Ereignisse nach Anbruch keinen Einfluss auf das Varianten-Calling hatten.

Stabilität der Nukleinsäure

Die Stabilität von Nukleinsäuren (DNA und RNA) und die damit verbundene Quantifizierung für die Verwendung mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay wurden anhand von FFPE-Proben aus mehreren Gewebetypen beurteilt. FFPE-Blöcke wurden geschnitten und alle Nukleinsäuren wurden gleichzeitig extrahiert. Die extrahierte Nukleinsäure wurde gründlich gemischt, quantifiziert, auf Nukleinsäurequalität überprüft und in zwei Sätze von Einwegröhrchen aliquotiert, die für zwei Zeitpunkte eingefroren wurden: T0-Kontrolle (Baseline) und T1-Test (≥ 28 Tage). Die gesamte extrahierte RNA wurde für die angegebenen Zeiträume bei --85 °C bis -65 °C und die gesamte extrahierte DNA bei --25 °C bis --15 °C gelagert und dann mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay über mehrere Replikate und Bediener hinweg verarbeitet. Die T1-Testbedingung wurde mit der Kontrolle hinsichtlich MSI-Status, TMB-Score, Genamplifikationen, kleiner DNA-Varianten, RNA-Fusionen und RNA-Spleißvarianten verglichen. Die Daten weisen darauf hin, dass Nukleinsäuren und die damit verbundene Quantifizierung, die mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay verwendet werden soll, bei Lagerung bei den empfohlenen Temperaturen (RNA bei -85 °C bis -65 °C und DNA bei -25 °C bis -15 °C) bis zu 28 Tage lang stabil bleibt.

Bibliotheksstabilität

Die Stabilität von Bibliotheken, die jeden der sechs sicheren Haltepunkte für den Assay (siehe Tabelle 5) nutzten, wurde anhand von FFPE-Proben aus mehreren Gewebetypen bewertet. Kontrollbibliotheken (T0, keine Haltepunkte) wurden unmittelbar nach Abschluss des Workflows sequenziert. Aliquots aus den gleichen Bibliotheken wurden an den Haltepunkten bei -25 °C bis -15 °C für die Zeit (T1) aufbewahrt, um die in Tabelle 5 aufgeführten Tage zu unterstützen. T1 wurde mit T0 hinsichtlich kleiner DNA-Varianten, TMB, Genamplifikationen, MSI, RNA-Fusionen und RNA-Spleißvarianten mit CDx und Tumorprofilierungsvarianten verglichen. Die Daten zeigen, dass die aus dem TSO Comprehensive (EU) Assay generierten Bibliotheken gemäß der Gebrauchsanweisung stabil sind.

Stabilität von FFPE-Gewebe auf Trägern

Die Stabilität von FFPE-Gewebe auf Trägern, das mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay verwendet wird, wurde durch Sektionierung von FFPE-Blöcken (5-µm-Abschnitte) aus verschiedenen eindeutigen Proben überprüft. Die Proben wurden auf Trägern bei Raumtemperatur (22 °C) gelagert und zu 2 Zeitpunkten geprüft. Die RNA wurde extrahiert und bei -65 °C bis -85 °C gelagert, und die DNA wurde vor dem Test extrahiert und weniger als 1 Woche lang bei -15 °C bis -25 °C gelagert. Nukleinsäurematerial wurde quantifiziert und dann innerhalb von 24 Stunden jedes Zeitpunkts mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay verarbeitet. Zu jedem Zeitpunkt wurden mehrere Replikate und Bediener pro Probe mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay getestet und mit dem T0-Zeitpunkt für MSI, TMB, Genamplifikationen, kleine DNA-Varianten, RNA-Fusionen und RNA-Spleißvarianten, einschließlich CDx- und Tumorprofilierungsvarianten, verglichen. Das Varianten-Calling wurde bewertet und erfüllte alle Akzeptanzkriterien, was darauf hindeutet, dass FFPE-Gewebe auf Trägern zur Verwendung mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay bei Raumtemperatur bis zu 4 Wochen (28 Tage) stabil ist. Es wird darauf hingewiesen, dass nach 4 Wochen (28 Tagen) aufgrund einer Kombination aus

Handhabungsfehlern und Lagerungsdauer ein Rückgang der MSI-Bibliotheks-QC-Gültigkeitsrate um 10 % festgestellt wurde. RNA-Fusionen und Spleißvarianten wiesen nach einer Lagerung auf Objektträgern über einen Zeitraum von 4 Wochen (28 Tagen) einen Rückgang der unterstützenden Reads um etwa 29 % auf.

Zuverlässigkeitsprüfung der Zugabetitration für Nukleinsäuren

Die Zugabe von Nukleinsäure für den TSO Comprehensive (EU)-Assay wurde durch Testen der DNA aus 33 FFPE-Proben mit 17 Gewebetypen bei Zugaben von 10 ng bis 500 ng und durch Testen der RNA aus fünf FFPE-Proben mit fünf Gewebetypen bei Zugaben von 10 ng bis 85 ng evaluiert. Die Bibliotheks-QC-Metriken wurden ausgewertet und waren probenabhängig. Die DNA-Ergebnisse legten nahe, dass einige, jedoch nicht alle QC-Metriken für DNA-Proben sich bei einer Zugabe über der nominalen Zugabe von 40 ng verändern:

- MEDIAN_INSERT_SIZE änderte sich bei einer Zugabe über 30 ng nicht.
- Bei MEDIAN_EXON_COVERAGE zeigte sich eine positive Korrelation mit höherer Zugabe.
- PCT_EXON_50X erhöhte sich bis zu 80 ng mit wachsender Zugabe.
- USABLE_MSI_SITES erhöhte sich mit wachsender Zugabe. Einige Proben mit weniger als 40 USABLE_MSI_SITES bei 40 ng erfüllten die Spezifikation bei höherer Zugabe. Dies würde die Berechnung eines MSI-Scores ermöglichen.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET erhöhte sich mit wachsender Zugabe.
- Bei Erhöhung der Zugabe erhöht sich COVERAGE_MAD in Richtung der oberen Spezifikationsgrenze.

Die QC-Metriken für RNA-Proben erhöhten sich (MEDIAN_INSERT_SIZE und TOTAL_ON_TARGET_READS) oder sanken (MEDIAN_CV_GENE_500X) bei Zugabemengen zwischen 10 ng und 40 ng, änderten sich im Allgemeinen jedoch nicht bei Zugabemengen zwischen 40 ng und 85 ng.

Leerwertgrenze

Der Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse (im Verhältnis zu erwarteten negativen Ergebnissen) wurde anhand von Replikattests mit angrenzendem normalen oder gutartigen FFPE-Gewebe ermittelt. Dieses Gewebe sollte keine somatischen Varianten für kleine DNA-Varianten, Genamplifikationen, MSI, RNA-Fusionen und RNA-Spleißvarianten enthalten. Für TMB wurden keinen falsch positiven Ergebnisse analysiert, da es hierfür keinen klinischen Schwellenwert gibt. Sechs DNA- und sechs RNA-FFPE-Proben wurden doppelt mit zwei Bedienern über drei Tage für beide Reagenzienchargen analysiert. Eine Teilmenge der Proben wurde erneut gepoolt und im Format 3x nur DNA und 3x nur RNA erneut sequenziert, um falsch positive Ergebnisse mit verschiedenen, von diesem Gerät unterstützten Multiplex-Konfigurationen zu evaluieren. Zudem wurden 30 zusätzliche RNA-Proben doppelt ausgeführt, die mit einer Reagenziencharge von zwei Bedienern verarbeitet wurden. Insgesamt wurden für jeden Variantentyp 168 mögliche Beobachtungen für DNA und 228 Beobachtungen für RNA durch ungültige Bibliotheken reduziert. Der Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse wurde für Amplifikationen auf Genebene und für kleine DNA-Varianten auf Positionsebene (ca. 1,9 Millionen Positionen) berechnet. Der Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse für DNA-Variantentypen ist in

Tabelle 46 dargestellt. TSO Comprehensive (EU) hat keine CDx-Ansprüche (Level 1) für kleine DNA-Varianten, sodass für Stufe 1 keine falsch positiven Ergebnisse für kleine DNA-Varianten gemeldet werden können. Die 271 falsch positiven wurden durch die TSO Comprehensive (EU) Wissensdatenbank behoben. Keine falsch positiven Ergebnisse waren klinisch signifikant (Stufe 2). Es gab 4 falsch positive Ergebnisse in Level 3, die sich aus 2 Varianten über 4 (2,4 %) Beobachtungen aus den 168 Beobachtungen ergaben. Die Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse für RNA-Fusionen und -Spleißvarianten betrug 0 %, wie in Tabelle 47 dargestellt.

Tabelle 46 Falsch positive Ergebnisse nach DNA-Variantentyp

Variantentyp	Falsch positive Ergebnisse
Genamplifikationen	0 % (0/9.912)
Kleine DNA-Varianten	0,0001 % (271/295.801.567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	n. z.*

* Falsch positive Ergebnisse können nicht ermittelt werden, da die TMB als Punktzahl angegeben wird und kein qualitatives Ergebnis beinhaltet.

Tabelle 47 Falsch positive Ergebnisse nach RNA-Variantentyp

Variantentyp	Falsch positive Ergebnisse
Fusion	0 % (0/227)
Spleißvariante	0 % (0/227)

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze für TSO Comprehensive (EU) wurde mithilfe von zwei Studien ermittelt. In Studie 1 wurden kleine RET-DNA-Varianten, RET-Fusionen und NTRK1–3-Fusionen untersucht. In Studie 2 wurden andere Tumor-Profiling-Varianten untersucht.

Studie 1

Die Nachweisgrenzen (LOD) von kleinen DNA-Varianten von NTRK1, NTRK3 und RET sowie von NTRK1–3- und RET-Fusionen wurden bestimmt. Die Nachweisgrenze ist der geringste Analytwert (zum Beispiel Varianten-Allelfrequenz oder bestätigende Reads), der konsistent erkannt werden kann (Nachweisgrenze von 95 % oder Wahrscheinlichkeit für Fehler zweiter Art von 5 %). Für die Studie wurden FFPE-Gewebe mit kleinen RET-DNA-Varianten (medulläres Schilddrüsenkarzinom), RET-Fusionen (papilläres Schilddrüsenkarzinom, atypischer Spitz-Nävus) und NTRK1–3-Fusionen (niedriggradiges Gliom, Glioblastoma multiforme, myofibroblastisches Sarkom, Sarkom, sekretorischer Brustkrebs, Dickdarmkrebs) sowie eine FFPE-Zelllinie mit kleinen NTRK1- und NTRK3-DNA-Varianten verwendet. Jede Probe wurde auf mindestens fünf Teststufen verdünnt (von ca. 0,01 bis 0,10 für kleine DNA-Varianten und 2 bis 25 bestätigende Reads für Fusionen). Für alle

Teststufen erfolgten 18 Messungen pro Charge und Variante, die von drei Bedienern und drei Sequenzierern generiert wurden, wobei die Bibliotheksvorbereitung an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen mit zwei Replikaten jeder Probenteststufe gestartet wurde. Es wurden zwei Reagenzienchargen getestet.

Bei DNA-Varianten wurden die beiden Chargen unabhängig voneinander mithilfe der Probitregression oder des Hit-Rate-Ansatzes (niedrigste Testebene mit einer Hit-Rate (Punktschätzung) ≥ 95 %) analysiert, um die LOD für die einzelnen Varianten je Charge zu bestimmen. Die größere LOD der beiden Reagenzienchargen wurde als Nachweisgrenze für die Variante verwendet (Tabelle 48).

Für RNA-Fusionen wurden die LOD-Werte für alle Fusionsgene anhand von FFPE-Zelllinien geschätzt. Die LODs wurden anschließend mithilfe von FFPE-Gewebe verifiziert, wobei doppelte Bibliotheksvorbereitungen von drei Bedienern, drei Geräten und drei Reagenzienchargen verwendet wurden. Dabei wurden 54 Messungen pro Variante nahe der durch FFPE-Zelllinien ermittelten Nachweisgrenze erstellt. Die angegebenen Nachweisgrenzen für die einzelnen Fusionen (Tabelle 49) sind die niedrigsten mittleren bestätigenden Reads, bei denen eine Hit-Rate (Punktschätzung) ≥ 95 % erreicht wurde.

Tabelle 48 Nachweisgrenze für kleine DNA-Varianten in NTRK1, NTRK3 und RET

Marker	Chr[1]	Position	Referenz	Alternative	Nachweisgrenze (Variantenallele Frequenz)
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 = Chromosom
[2] Diese DNA-Varianten wurden mittels Probitregression analysiert. Die anderen DNA-Varianten wurden mit dem Hit-Rate-Ansatz analysiert.

Tabelle 49 Nachweisgrenze für NTRK- und RET-Fusionen

Gen	Fusion	Nachweisgrenze (Bestätigende Reads)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2

Gen	Fusion	Nachweisgrenze (Bestätigende Reads)
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Studie 2

Es wurden die Nachweisgrenzen (LOD) für Tumor-Profiling-Varianten untersucht, die von TSO Comprehensive (EU) gemeldet wurden. Die LOD ist der geringste Analytwert (Varianten-Allelfrequenz oder bestätigende Reads), der konsistent erkannt werden kann (Hit-Rate von 95 % oder Wahrscheinlichkeit für Fehler zweiter Art von 5 %). FFPE-Proben aus 17 Gewebetypen mit Varianten wurden auf mehrere Testebenen verdünnt. Pro Ebene wurden sechs Beobachtungen von zwei Bedienern mit unterschiedlichen Reagenzienchargen und Geräten generiert.

DNA-Varianten

Die LODs von 10 kleinen DNA-Variantenklassen (insgesamt 25 Varianten) und zwei DNA-Genamplifikationen (ERBB2 und MET) wurden bestimmt und in Bereichen zusammengefasst (Tabelle 50). RET-Varianten aus der Studie 1 LOD sind ebenfalls enthalten. Bei zwei der drei Insertionen über 5 bp betrugen die LODs 0,034 und 0,036 VAF. Bei der dritten betrug die LOD 0,215 VAF. Bei der letzteren handelte es sich um eine Insertion in einer Region mit geringer Komplexität, in der die Insertion zusätzliche Wiederholungen hinzufügt, das Alignment beeinträchtigt und mehr Reads für einen konsistenten Nachweis erfordert. Daher können einige wenig komplexe genomische Kontexte den Nachweis von Insertionen > 5 bp beeinträchtigen.

Tabelle 50 Nachweisgrenze für kleine DNA-Varianten und Genamplifikationen

Typ (Maßeinheit für LOD)	Variantenklasse/ genomischer Kontext	Anzahl der Varianten	Bereich (VAF)
Kleine DNA-Varianten (Variantenallel Frequenz)	SNVs	5	0,016–0,064
	MNVs	3	0,022–0,048
	Insertion (1–2 bp) in der Nähe von Homopolymer-Wiederholungen	2	0,086–0,104
	Insertion (1–2 bp) in der Nähe von Dinukleotid-Wiederholungen	2	0,038–0,051
	Insertion (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertion (> 5 bp und bis zu 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deletion (1–2 bp) in der Nähe von Homopolymer-Wiederholungen	2	0,094–0,100
	Deletion (1–2 bp) in der Nähe von Dinukleotid-Wiederholungen	2	0,033–0,070
	Deletion (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Deletion (> 5 und bis zu 25 bp)	2	0,047–0,055
Genamplifikationen (Fold-Change)	Nach Gen (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Die Analyse der nicht zielgerichteten Varianten wurde anhand von Proben aus Studie 1 durchgeführt, die mindestens fünf Teststufen aufwiesen. Jede nicht zielgerichtete Variante wurde einzeln analysiert und eine LOD nur für Varianten mit mindestens einer Trefferquote von > 0 % und ≤ 95 % sowie mindestens einer Trefferquote von ≥ 95 % geschätzt. Tabelle 51 zeigt die Perzentile zusammen mit den minimalen und maximalen LoDs, die pro Klasse für die nicht zielgerichteten Varianten beobachtet wurden. Die nicht zielgerichteten Varianten liefern mehr Varianten pro Klasse als in Studie 2 getestet wurden und stimmen mit den LoD-Bereichen aus Tabelle 50 überein.

Tabelle 51 Zusammenfassende Statistik zu den Nachweisgrenzen nach Klasse der nicht zielgerichteten Varianten (aus Studie 1)

Klasse	N	Min.	25 %	50 %	75 %	90 %	Max.
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

Fusionen

Für 19 Fusionen, die 20 Gene im TSO Comprehensive (EU)-Panel abdecken, wurden LODs zwischen 9 und 31,3 bestätigenden Reads ermittelt (Tabelle 52). Weitere drei Gene (NTRK1–3) wurden in der anderen Studie getestet. Das RET-Gen wurde hier und in der anderen Studie getestet. Die Daten von 16 Fusionen mit ermittelten LODs stimmten mit der gemeinsamen LOD von 16 bestätigenden Reads bei Verwendung einer zweiseitigen oberen Konfidenzgrenze (UCL) von 95 % überein. Bei zwei Fusionen betrug die LOD 24,7 und 31,3 bestätigende Reads, die nicht mit der gemeinsamen LOD übereinstimmten.

Die Fusion FGFR2-SRPK2 mit einer LOD von 24,7 bestätigenden Reads wies wiederholte Überlappungsbereiche am Bruchpunkt auf, wie in der TSO Comprehensive (EU)-Assay-Software annotiert. Repeat-Regionen innerhalb eines Bruchpunkts weisen in der Regel eine geringere Evidenz auf, da die Reads an anderer Stelle im Genom zugeordnet oder ggf. nicht aligniert werden. Darüber hinaus erschweren Repeat-Regionen den Assemblierungsprozess (der zur Identifizierung von Fusionssequenzen verwendet wird) und erfordern für die Zusammensetzung der richtigen Sequenz zusätzliche Evidenz. SEPT14-EGFR ist ein weiteres Beispiel für eine Fusion mit homologer Sequenz am Bruchpunkt.

Die Fusion BCL2-IGHJ5 mit einer LOD von 31,3 bestätigenden Reads wies ein extrem kurzes Gen (IGHJ5) mit dem Bruchpunkt in der Nähe des Beginns eines Exons auf, was kurze Alignments mit Lücken erforderte. Folglich waren für einen konsistenten Nachweis mehr Reads erforderlich.

Tabelle 52 Nachweisgrenze für Fusionen

Fusion	Bruchpunkt Gen A	Bruchpunkt Gen B	LOD	Gemeinsame 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

Fusion	Bruchpunkt Gen A	Bruchpunkt Gen B	LOD	Gemeinsame LoD
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	Ja
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	Ja
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	Ja
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	Nein
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	Nein
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	Ja

Spleißvarianten

Bei den beiden RNA-Spleißvarianten – MET und EGFR – betrug die LOD 18,7 bzw. 16,7 zugrundeliegende Reads.

Tumoranteil

Die Ergebnisse der Studie bilden die Grundlage für Empfehlungen hinsichtlich des Tumoranteils klinischer Proben. Im Allgemeinen gilt: je größer der Tumoranteil, desto stärker das „Signal" (VAF, Fold-Change oder bestätigende Reads) für Varianten im Tumor. Die Empfehlungen für den Mindesttumoranteil beruhen auf den folgenden Beobachtungen: Die LOD-Werte für kleine DNA-Varianten sind nicht größer als 0,104 VAF (mit Ausnahme der TP53-Insertion). Zum Nachweis auslösender Mutationen im Tumor (Variantenallelfrequenz von 0,50) wird ein Tumoranteil von 20 % empfohlen, sodass diese Mutationen VAFs von 0,10 aufweisen und so auf bzw. über der LOD liegen. Bei einem Tumoranteil von 20 % werden Gene, die mit einem Fold-Change von bis zu 5,5 (11 Kopien) amplifiziert sind, bei einer Nachweisgrenze eines Fold-Changes von 1,8 konsistent nachgewiesen. Bei einem Tumoranteil von 20 % werden Fusionen mit 74 bestätigenden Reads bei einer Nachweisgrenze von 14,7 bestätigenden Reads konsistent nachgewiesen.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des TSO Comprehensive (EU)-Assays wurde anhand von zwei Studien ermittelt. In Studie 1 wurden neben NTRK- und RET-Fusionsvarianten zusätzlich kleine RET-DNA-Varianten untersucht. In Studie 2 wurden zusätzliche Tumor-Profiling-Varianten untersucht.

Studie 1

Die Reproduzierbarkeit des TSO Comprehensive (EU)-Assays wurde anhand dieser Studie an drei Teststandorten (ein interner, zwei externe) mit zwei Bedienern pro Standort, zwei Replikaten innerhalb eines Laufs und an drei nicht aufeinander folgenden Testtagen ermittelt. Die Tests wurden mit einem Reproduzierbarkeitspanel durchgeführt, das DNA-Proben mit spezifischen bekannten kleinen RET-DNA-Varianten sowie RNA-Proben mit spezifischen bekannten NTRK1–3- und RET-Fusionsvarianten aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben und Zelllinien enthielt. Das Panel enthielt DNA- und RNA-Panel-Bestandteile mit niedrigen und hohen Variantengraden. Für jede Variantenklasse war die Anzahl an Panel-Bestandteilen mit niedrigem und hohem Variantengrad gleich. Bei Panel-Bestandteilen mit hohem Grad wurde die Untersuchung bei etwa dem Zwei- bis Dreifachen der LOD angesetzt, bei Bestandteilen mit niedrigem Grad etwa auf Ebene der LOD. An den einzelnen Standorten wurden von allen Bedienern die Panel-Bestandteile dreimal in doppelter Ausführung getestet, wodurch sechs Beobachtungen pro Ziel und Panel-Bestandteil festgehalten wurden. An jedem Standort wurden damit 36 Beobachtungen pro Panel-Bestandteil generiert (3 Standorte/Geräte × 2 Bediener × 2 Replikate innerhalb eines Laufs × 3 Starttage).

PPCs und PNCs für untersuchte kleine DNA-Varianten und untersuchte RNA-Fusionsvarianten mit hohem Grad wurden als primäre Endpunkte festgelegt. Der PPC und der PNC für untersuchte kleine DNA-Varianten und untersuchte RNA-Fusionsvarianten mit niedrigem Grad wurden als sekundäre Endpunkte berechnet. Zweiseitige Konfidenzintervalle (KIs) von 95 % wurden nach der Wilson-Score-Methode für alle Endpunkte berechnet. Der PPC und der PNC (mit zugehörigen KIs von 95 %) der untersuchten Panel-Bestandteile mit hohem Grad wurden anhand von Primäranalysen bestimmt, indem Beobachtungen aus dem TSO Comprehensive (EU)-Assay für ein bestimmtes Ziel in einer Gruppe von Panel-Bestandteilen zusammengefasst wurden, die über Standorte/Geräte, Bediener und Läufe hinweg repräsentativ für die jeweilige Variantenklasse (zum Beispiel kleine DNA-Varianten und RNA-Fusionen) war. Für jede untersuchte Variante wurden Beobachtungen des TSO Comprehensive (EU)-Assays in anderen Panel-Bestandteilen mit hohem Grad, die für denselben Variantentyp untersucht wurden, jedoch nicht dieselbe, durch die Mehrheitsregel bestimmte Variante enthielten, zum berechneten PNC kombiniert. Der Gesamt-PPC und der Gesamt-PNC für die Panel-Bestandteile mit niedrigem Grad wurden in ähnlicher Weise festgelegt.

Kleine RET-DNA-Varianten

Bei den Panel-Bestandteilen für kleine DNA-Varianten mit hohem Grad lag der Gesamt-PPC bei 100,0 % (207/207; 95 % KI: 98,2 % bis 100,0 %) (Tabelle 53). Der Gesamt-PNC für die Panel-Bestandteile für kleine DNA-Varianten mit hohem Grad lag bei 100,0 % (1.035/1.035; 95 % KI: 99,6 % bis 100,0 %) (Tabelle 54). Bei den untersuchten Panel-Bestandteilen für kleine DNA-Varianten mit niedrigem Grad lag der Gesamt-PPC bei 99,1 % (210/212; 95 % KI: 96,6 % bis 99,7 %) und der Gesamt-PNC betrug 100,0 % (1.026/1.026; 95 % KI: 99,6 % bis 100,0 %).

Tabelle 53 PPC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von kleinen RET-DNA-Varianten in untersuchten Panel-Bestandteilen mit hohem und niedrigem Grad

Variantengrad	Variantentyp	Untersuchte Variante (Nukleotid)	Untersuchte Variante (Aminosäure)	N	Mittlere VAF[1]	PPC (%) (n/N)	95 % KI[2]
ca. 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 kleine DNA Varianten hoch	Alle kleine DNA Varianten hoch	Alle kleine DNA Varianten hoch	207	N/A[1]	100,0 (207/207)	98,2 (100,0)
ca. 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 kleine DNA Varianten niedrig	Alle kleine DNA Varianten niedrig	Alle kleine DNA Varianten niedrig	212	N/A[1]	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

[1] Abkürzungen: n. z., nicht zutreffend; VAF, Variantenallelfrequenz.
[2] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Tabelle 54 PNC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von kleinen RET-DNA-Varianten in untersuchten Panel-Bestandteilen mit hohem und niedrigem Grad

Variantengrad	Variantentyp	Untersuchte Variante (Nukleotid)	Untersuchte Variante (Aminosäure)	N[1]	PNC (%) (n/N)	95 % KI[2]
ca. 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 kleine DNA Varianten hoch	Alle kleine DNA Varianten hoch	Alle kleine DNA Varianten hoch	1.035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
ca. 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 kleine DNA Varianten niedrig	Alle kleine DNA Varianten niedrig	Alle kleine DNA Varianten niedrig	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

[1] Alle Beobachtungen wurden aus Panel-Bestandteil-Variantenkombinationen gepoolt, bei denen der mehrheitsabhängige Call negativ ist, (untersuchte Varianten mit Fusionen, bei denen weniger als 50 % der Calls positiv sind).
[2] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

In Tabelle 55 ist die Varianzkomponentenanalyse der Variantenallelfrequenzen (VAFs) für alle ca. 36 Beobachtungen für jeden Panel-Bestandteil aufgeführt. Die Standardabweichung (SA) und der Variationskoeffizient in Prozent (% VK; insgesamt und für jede Quelle) wurden berechnet und für jede untersuchte kleine RET-DNA-Variante angegeben.

Tabelle 55 TSO Comprehensive (EU)-Assay-Varianzkomponentenanalyse der VAF in Panel-Bestandteilen für untersuchte kleine DNA-Varianten

Variantengrad	Variantentyp	Untersuchte Variante (Nukleotid)	Untersuchte Variante (Aminosäure)	N	Mittlere VAF	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (% VK)	Tages-SA (% VK)	Replikat-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
ca. 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)
ca. 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- und RET-Fusionen

Bei Panel-Bestandteilen für RNA-Fusionen mit hohem Grad lag der Gesamt-PPC bei 99,3 % (285/287; 95 % KI: 97,5 % bis 99,8 %) (Tabelle 56). Der PPC lag für alle Panel-Bestandteile mit hohem Grad bei 100 %, ausgenommen BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % KI: 81,9 % bis 98,5 %]). Der Gesamt-PNC für die Panel-Bestandteile für RNA-Fusionen mit hohem Grad lag bei 100,0 % (1.724/1.724; 95 % KI: 99,8 % bis 100,0 %) (Tabelle 57). Für Panel-Bestandteile für untersuchte RNA-Fusionen mit niedrigem Grad betrug der Gesamt-PPC 95,4 % (272/285; 95 % KI: 92,3 %, 97,3 %). Der Gesamt-PNC betrug 100,0 % (1.851/1.851; 95 % KI: 99,8 % bis 100,0 %).

Tabelle 56 PPC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von NTRK- und RET-Fusionen in untersuchten Panel-Bestandteilen mit hohem und niedrigem Grad

Variantengrad	Untersuchte Fusion	N	Bestätigende Reads, Mittelwert	PPC (%) (n/N)	95 % KI*
ca. 2–3x 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 Fusionen (hoch)	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
ca. 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 Fusionen (niedrig)	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall (KI) von 95 %.

Tabelle 57 PNC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von NTRK- und RET-Fusionen in nicht anvisierten Panel-Bestandteilen mit hohem und niedrigem Grad

Variantengrad	Untersuchte Fusionen	N[1]	PNC (%) (n/N)	95 % KI[2]
ca. 2–3x 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 Fusionen (hoch)	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
ca. 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 Fusionen (niedrig)	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

[1] Alle Beobachtungen wurden aus Panel-Bestandteil-Variantenkombinationen gepoolt, bei denen der mehrheitsabhängige Call negativ ist, (untersuchte Varianten mit Fusionen, bei denen weniger als 50 % der Calls positiv sind).
[2] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall (KI) von 95 %.

Tabelle 58 zeigt die Varianzkomponentenanalyse der bestätigenden Reads für die ca. 36 Beobachtungen innerhalb der einzelnen untersuchten Fusionen. SA und % VK (insgesamt und für jede Quelle) wurden für jede untersuchte Fusion berechnet und dargestellt.

Tabelle 58 TSO Comprehensive (EU) -Assay-Varianzkomponentenanalyse der bestätigenden Reads in Panel-Bestandteilen für untersuchte RNA-Fusionen

Variantengrad	Fusion	N	Bestätigende Reads, Mittelwert	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (% VK)	Tages-SA (% VK)	Replikat-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
ca. 2–3x 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)
ca. 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

In einer zweiten Studie wurde die Reproduzierbarkeit des TSO Comprehensive (EU)-Tests an drei Teststandorten (zwei externe und ein interner), mit zwei Bedienern/Geräten pro Standort, drei einzelnen Reagenzienchargen an vier Testtagen (nicht aufeinanderfolgend) und mit zwei Sequenzierungsläufen pro Probenbibliothek ermittelt.

Die Tests wurden mit aus 41 FFPE-Gewebeproben und einer FFPE-Zelllinie extrahierten DNA- und RNA-Proben durchgeführt (wobei eine FFPE-Gewebeprobe und die FFPE-Zelllinie zur Bildung von jeweils zwei Panel-Bestandteilen verwendet wurden). Bei den Gewebeproben handelte es sich um folgende Arten: Blase, Knochen, Gehirn, Brust, Dickdarm, Leerdarm, Niere, Leber, Lunge, Eierstock, Prostata, Haut, Weichgewebe, Magen, Schilddrüse und Gebärmutter. Insgesamt wurden 44 Panel-Bestandteile getestet, darunter DNA-Panel-Bestandteile mit kleinen DNA-Varianten (SNVs, MNVs, Insertionen und Deletionen), Genamplifikationen, unterschiedlichen TMB-Scores, hohen MSI-Scores und RNA-Panel-Bestandteile mit Fusionen und Spleißvarianten. Die meisten Panel-Bestandteile wiesen bekannte Zielvarianten in einer Größenordnung auf, die etwa dem Zwei- bis Dreifachen der variantenspezifischen Nachweisgrenze entsprach (ca. 2–3×LOD).

Die LoD ist die Analytkonzentration, bei der die beobachteten Testergebnisse in ≥ 95 % der Fälle positiv sind (Nachweis einer Variante relativ zum Schwellenwert des TSO Comprehensive (EU)-Assays). Die mittleren beobachteten Variantengrade wurden in folgende Kategorien eingeteilt: ca. < 2× LoD (beobachtete Varianten bei < 1,5× LoD), ca. 2–3× LoD (beobachtete Varianten bei 1,5× LoD bis 3,4× LoD) und ca. > 3× LoD (beobachtete Varianten bei > 3,4× LoD).

PPCs für kleine DNA-Varianten, Genamplifikationen, MSI-Hoch- und RNA-Varianten wurden anhand von kombinierten Beobachtungen aus allen Sequenzierungsläufen und von allen Standorten berechnet. PNCs wurden in vergleichbarer Weise für kleine DNA-Varianten, Genamplifikationen und RNA-Varianten berechnet. Für die einzelnen bekannten Zielvarianten wurde der PNC anhand von Beobachtungen aus dem TSO Comprehensive (EU)-Assay bei Panel-Bestandteilen desselben Variantentyps berechnet, die jedoch unterschiedliche Varianten enthielten, nicht von derselben Quellprobe stammten und nicht die Mehrheitsregel für diese Variante erfüllten (< 50 % positive Calls). Die Daten wurden hierbei über Standorte, Betreiber/Geräte, Tage, Reagenzienchargen und Sequenzierungsläufe hinweg kombiniert. Zweiseitige Konfidenzintervalle (KIs) von 95 % wurden nach der Wilson-Score-Methode berechnet.

Kleine DNA-Varianten

Tabelle 59 zeigt die PPCs für untersuchte kleine DNA-Varianten. Die PPCs variierten zwischen 91,3 % für BRAF-SNV und 100 % für die Mehrzahl der kleinen DNA-Varianten.

Tabelle 59 PPC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von kleinen DNA-Varianten in kombinierten Bestandteilen untersuchter Panels

Beobachteter Varianten-grad[1]	Varianten-typ	Untersuchte Variante (Nukleotid)	Untersuchte Variante (Aminosäure)	Mittlere VAF[2]	PPC (%) (n/N)	95 % KI[3]
ca. 2–3x LOD	DELETION	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100.0)
ca. 2–3x LOD	DELETION	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
ca. 2–3x LOD	INSERTION	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3.100,0)
ca. 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)
ca. 2–3x LOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)

Beobachteter Varianten-grad[1]	Varianten-typ	Untersuchte Variante (Nukleotid)	Untersuchte Variante (Aminosäure)	Mittlere VAF[2]	PPC (%) (n/N)	95 % KI[3]
ca. 2–3x LOD	DELETION	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
ca. 2–3x LOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
ca. 2–3x LOD	DELETION	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
ca. 2–3x LOD	INSERTION	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
ca. 2–3x LOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
ca. 2–3x LOD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
ca. 2–3x LOD	INSERTION	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
ca. 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)
ca. 2–3x LOD	INSERTION	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

[1] Aus dem Mittelwert für die beobachtete Variantenallelfrequenz berechneter Variantengrad.
[2] Aus beobachteten Assay-Ergebnissen berechneter Mittelwert für die Variantenallelfrequenz.
[3] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Die PNCs lagen bei allen kleinen DNA-Varianten bei 100 %.

Tabelle 60 zeigt die Varianzkomponentenanalyse der VAF-Ergebnisse für die einzelnen Variationsquellen und die Gesamtvariation für alle Panel-Bestandteile mit untersuchten kleinen DNA-Varianten.

Tabelle 60 Varianzkomponentenanalyse der VAF für untersuchte kleine DNA-Varianten

Untersuchte Variante (Nukleotid)	N	Mittlere VAF	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (Standort) (% VK)	Tages-SA (Standort, Bediener) (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Lauf-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
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)

Bei zwei der untersuchten kleinen DNA-Varianten war die Anzahl der Beobachtungen zu gering für die Anwendung eines Varianzkomponentenmodells. Für diese beiden untersuchten Varianten betrugen die Gesamt-SAs 0,027 für die Variante chr1_27024001_C_CG und 0,001 für die Variante chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genamplifikationen

Tabelle 61 zeigt die PPCs für untersuchte Genamplifikationen. Die PPCs lagen für MET und ERBB2 bei 100,0 %.

Tabelle 61 PPC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von Genamplifikationen in kombinierten untersuchten Panel-Bestandteilen

Beobachteter Variantengrad[1]	Untersuchte Variante	Mittlerer beobachteter Fold-Change[2]	Prozentsatz positiver Call (%)	95 % KI[3]
ca. 2–3x LOD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
ca. 2–3x LOD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

[1] Aus dem mittleren beobachteten Fold-Change berechneter Variantengrad.
[2] Aus beobachteten Assay-Ergebnissen berechneter mittlerer Fold-Change.
[3] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Die PNCs lagen bei allen Genamplifikationen bei 100 %.

Tabelle 62 zeigt die Varianzkomponentenanalyse der Fold-Change-Ergebnisse für die einzelnen Variationsquellen und die Gesamtvariation für alle Panel-Bestandteile mit untersuchten Genamplifikationen.

Tabelle 62 Varianzkomponentenanalyse des Fold-Change für untersuchte Genamplifikationen

Untersuchte Variante	N	Mittlerer Fold-Change	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (Standort) (% VK)	Tages-SA (Standort, Bediener) (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Lauf-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
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

Tabelle 63 zeigt die PPCs für untersuchte, als MSI-Hoch eingestufte Panel-Bestandteile. Die PPCs lagen bei beiden als MSI-Hoch eingestuften Panel-Bestandteilen bei 100 %.

Tabelle 63 PPC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis des MSI-H-Status in kombinierten untersuchten Panel-Bestandteilen

Panel-Bestandteil	Mittlerer MSI-Score[1]	N	Prozentsatz positiver Call (%)	95 % KI[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 Bestandteile		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

[1] Aus beobachteten Assay-Ergebnissen berechneter mittlerer MSI-Score.
[2] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Tabelle 64 zeigt die Varianzkomponentenanalyse der MSI-Score-Ergebnisse für die einzelnen Variationsquellen und die Gesamtvariation für alle Panel-Bestandteile, die auf den MSI-Hoch-Status untersucht wurden.

Tabelle 64 Varianzkomponentenanalyse des MSI-Scores für als MSI-Hoch eingestufte Panel-Bestandteile

Panel-Bestandteil	N	Mittlerer MSI-Score	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (Standort) (% VK)	Tages-SA (Standort, Bediener) (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Lauf-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
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

Um die Reproduzierbarkeit der TMB-Scores zu ermitteln, wurde eine quantitative Analyse der Bewertung bei bestimmten TMB-Panel-Bestandteilen durchgeführt, die eine repräsentative Auswahl der zu erwartenden TMB-Scores darstellten. Tabelle 65 zeigt die Varianzkomponentenanalyse der TMB-Score-Ergebnisse für die einzelnen Variationsquellen und die Gesamtvariation für die TMB-Panel-Bestandteile. Die Gesamt-SAs der TMB-Scores betrugen 1,0 (% VK = 13) für einen Panel-Bestandteil (mittlerer TMB-Wert = 7,6) und 1,1 (% VK = 2) für einen anderen Panel-Bestandteil (mittlerer TMB-Score = 63,2).

Tabelle 65 Varianzkomponentenanalyse des TMB-Scores für untersuchte Bestandteile des TMB-Panels

Panel-Bestandteil*	N	Mittlerer TMB-Score	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (Standort) (% VK)	Tages-SA (Standort, Bediener) (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Lauf-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
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)

* Bei einem Bestandteil des TMB-Panels war die Anzahl der Beobachtungen zu gering (N = 2) für die Anwendung eines Varianzkomponentenmodells. Für diesen Panel-Bestandteil betrug die Gesamt-SA 1,7.

RNA-Varianten

Tabelle 66 zeigt die PPCs für untersuchte RNA-Varianten. Die PPCs variierten zwischen 91,7 % für KIF5B-RET und 100 % für die meisten der RNA-Varianten.

Tabelle 66 PPC des TSO Comprehensive (EU)-Assays zum Nachweis von RNA-Varianten in kombinierten untersuchten Panel-Bestandteilen

Beobachteter Variantengrad[1]	Variantentyp	Untersuchte Variante	Mittelwert für bestätigende Reads[2]	PPC (%) (n/N)	95 % KI[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)
ca. 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	Spleißvariante	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
ca. 2–3x LOD	Spleißvariante	MET Exon 14-Skipping	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

[1] Aus dem Mittelwert für beobachtete bestätigende Reads berechneter Variantengrad.
[2] Aus beobachteten Assay-Ergebnissen berechneter Mittelwert für bestätigende Reads.
[3] Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Der PNC betrug für alle untersuchten RNA-Varianten 100 %, ausgenommen für die FGFR2-SRPK2-Fusion (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % KI: 98,96 % bis 99,84 %)).

Tabelle 67 zeigt die Varianzkomponentenanalyse der bestätigenden Reads für die einzelnen Variationsquellen und die Gesamtvariation für alle Panel-Bestandteile mit untersuchten RNA-Varianten.

Tabelle 67 Varianzkomponentenanalyse der bestätigenden Reads für untersuchte RNA-Varianten

Untersuchte Variante	N	Bestätigende Reads, Mittelwert	Standort-SA (% VK)	Bediener-SA (Standort) (% VK)	Tages-SA (Standort, Bediener) (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Lauf-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
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;GOPC	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-Spleißvariante	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET Exon 14 Skipping-Spleißvariante	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Präzision im Labor

Die Präzision von TSO Comprehensive (EU) im Labor wurde anhand von zwei Studien ermittelt. In Studie 1 wurden NTRK- und RET-Fusionen sowie kleine RET-DNA-Varianten untersucht. In Studie 2 wurden die TMB und die MSI untersucht.

Studie 1

Die Präzision innerhalb des Labors wurde für NTRK1–3-Fusionen (Gliom minderen Grades, Glioblastoma multiforme, myofibroblastisches Sarkom, sekretorisches Mammakarzinom), RET-Fusionen (Schilddrüsenkarzinom und Hautgewebe von einer unbekannten Krebsart) und kleine RET-DNA-Varianten (medulläres Schilddrüsenkarzinom) mit FFPE-Gewebe aus den angegebenen Krebsarten bestimmt. Jede Probe wurde bei zwei Variantengraden getestet: ca. 1x LoD (niedriger Variantengrad) und ca. 2–3x LoD (hoher Variantengrad), mit Ausnahme der Probe mit CCDC6-RET, die nur bei niedrigem Variantengrad getestet wurde. Alle Proben wurden auf sämtlichen Teststufen bei allen Bibliotheksvorbereitungen von drei (3) Bedienern in

doppelter Ausführung getestet. Die einzelnen Bediener begannen die Bibliotheksvorbereitung an drei (3) nicht aufeinanderfolgenden Tagen und führten die Sequenzierung auf drei (3) bestimmten NextSeq 550Dx-Geräten durch. Es wurden drei (3) Reagenzienchargen getestet, wobei pro Stufe 54 Beobachtungen generiert wurden. Bei bestimmten Stufen wurden aufgrund von ungültigen Bibliotheken weniger als 54 Beobachtungen generiert.

Qualitative Analyse

Die qualitative Konkordanz des Varianten-Callings wurde für die beiden Variantengrade einer bestimmte Variante anhand von gepoolten Messungen über alle Variablen (Bediener, Reagenzienchargen, Instrumente, Tage und Wiederholungen) getrennt ausgewertet. PPCs und PNCs sowie die zugehörigen zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalle (Wilson-Score) sind in Tabelle 68 (kleine DNA-Varianten) und Tabelle 69 (RNA-Fusionen) zusammengefasst.

Bei hohem Variantengrad (ca. 2–3x LoD) zeigte der TSO Comprehensive (EU)-Assay 100 % für PPC und PNC für alle getesteten Varianten.

Bei niedrigem Variantengrad (ca. 1x LOD) reichte der PPC für kleine DNA-Varianten von 83,3 % bis 98,1 % und der PPC für RNA-Fusionen von 90,7 % bis 100 %. Bei Varianten mit PPC < 95 % lagen die mittleren VAFs (RET C634Y und RET D898_E901del) oder die bestätigenden Reads (NCOA4-RET und BCAN-NTRK1) unter den jeweiligen Nachweisgrenzen. Auf niedrigem Variantengrad wurde für alle Varianten ein PNC von 100 % erreicht.

Tabelle 68 Qualitative Ergebnisse für untersuchte DNA-Varianten

Variantengrad	Variante	Variantentyp	Mittlere VAF	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
ca. 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)

Variantengrad	Variante	Variantentyp	Mittlere VAF	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
ca. 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)

* Die Nukleotidänderungen sind für jede Variante im Abschnitt Nachweisgrenze aufgeführt, mit Ausnahme von RET D631_ L633delinsE, bei der es sich um Chromosom 10, Position 43609940, Referenz ACGAGCT, Alternative A handelt.

Tabelle 69 Qualitative Ergebnisse für untersuchte RNA-Fusionen

Variantengrad	Fusion	Bestätigende Reads, Mittelwert	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
ca. 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-Zelllinie)	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 (Probe 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) 99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (Probe 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Variantengrad	Fusion	Bestätigende Reads, Mittelwert	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
ca. 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 -Zelllinie)	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	N. z.	nicht getestet	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (Probe 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) 99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (Probe 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Quantitative Analyse

Anhand einer REML-Varianzkomponentenanalyse (begrenzte maximale Wahrscheinlichkeit) wurden die Gesamtvariation der zugrunde liegenden kontinuierlichen Variablen (VAF für kleine DNA-Varianten und bestätigende Reads für RNA-Fusionen) ermittelt und Präzisionsfaktoren [Standardabweichung (SA), Variationskoeffizient (VK)] für alle Variationsquellen [Bediener, Geräte, Tage, Reagenzienchargen, Residualkomponente und Gesamtwert] bestimmt. Die Ergebnisse werden für kleine DNA-Varianten in Tabelle 70 und für RNA-Fusionen in Tabelle 71 dargestellt.

Wie bei der Binomialverteilung zu erwarten, nahm die Variation der VAF mit dem Mittelwert zu. Wie bei Zähldaten zu erwarten, nahm die Variation bei den bestätigenden Reads mit dem Mittelwert zu. Die

Residualkomponente trug sowohl bei kleinen DNA-Varianten als auch bei RNA-Fusionen auf beiden Ebenen am stärksten zur Gesamtvarianz bei. Daraus folgt, dass der Nachweis dieser Varianten durch TSO Comprehensive (EU) unabhängig von Bedienern, Chargen, Geräten und Tagen erfolgt.

Tabelle 70 Qualitative SA- und VK-Ergebnisse für untersuchte kleine DNA-Varianten

VAF-Grad	Variante	Variantentyp	Anzahl gültiger Versuche	Mittlere VAF	Bediener-SA (%VK)	Geräte-SA (%VK)	Chargen-SA (%VK)	Tages-SA (%VK)	Residual-SA (%VK)	Gesamt-SA (%VK)
ca. 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)
ca. 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)

Tabelle 71 Qualitative SA- und VK-Ergebnisse für untersuchte RNA Fusionen

Grad bestätigender Reads	Fusion	Anzahl gültiger Versuche	Bestätigende Reads, Mittelwert	Bediener-SA (%VK)	Geräte-SA (%VK)	Chargen-SA (%VK)	Tages-SA (%VK)	Residual-SA (%VK)	Gesamt-SA (%VK)
ca. 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 (Zelllinie)	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 (Probe 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Probe 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Grad bestätigender Reads	Fusion	Anzahl gültiger Versuche	Bestätigende Reads, Mittelwert	Bediener-SA (% VK)	Geräte-SA (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Tages-SA (% VK)	Residual-SA (% VK)	Gesamt-SA (% VK)
ca. 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 (Zelllinie)	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 (Probe 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Probe 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studie 2

Die Präzision innerhalb des Labors wurde für die TMB und die MSI bestimmt. Fünf NSCLC FFPE-DNA-Proben für TMB und sieben CRC FFPE-Proben für MSI-Stabil und MSI-Hoch wurden zur Bestimmung der Präzision auf verschiedenen Stufen über den Score-Bereich verwendet. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung von drei (3) Bedienern an drei (3) Tagen mit drei (3) Bibliotheksvorbereitungen für drei (3) Reagenzienchargen unter Verwendung von drei NextSeq 550Dx Geräten durchgeführt, wobei 54 Beobachtungen pro Stufe generiert wurden.

Die qualitative Konkordanz wurde für den MSI-Status bestimmt. Der TSO Comprehensive (EU)-Assay zeigte eine 100%ige Konkordanz beim Prozentsatz positiver Calls und dem Prozentsatz negativer Calls für den MSI-Status. Da der TSO Comprehensive (EU)-Assay die TMB in Form eines TMB-Scores bestimmt, konnte die qualitative Konkordanz nicht ermittelt werden.

Die Gesamtvariation von TMB- und MSI-Score sowie der Beitrag der einzelnen Quellen (Geräte, Bediener, Chargen, Tage und Residualkomponente) wurden mithilfe eines Varianzkomponentenmodells für eine Reihe von Scores quantifiziert. Die Standardabweichung (SA) und der Variationskoeffizient (VK) sind für die TMB in Tabelle 72 und für die MSI in Tabelle 73 nach Stufe aufgeschlüsselt. Bei bestimmten Stufen wurden aufgrund von ungültigen Bibliotheken weniger als 54 Beobachtungen generiert.

Tabelle 72 Quantitative Ergebnisse für den TMB-Score (SA und VK)

Stufe	Mittlerer TMB-Score	Anzahl gültiger Versuche	Bediener-SA (% VK)	Geräte-SA (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Tages-SA (% VK)	Rest-SD (% VK)	Standardabweichung insgesamt (% VK)
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)

Tabelle 73 Quantitative Ergebnisse für den MSI-Score (SA und VK)

MSI-Status	Stufe	Mittlerer MSI-Score (%)	Anzahl gültiger Versuche	Bediener-SD (% VK)	Geräte-SA (% VK)	Chargen-SA (% VK)	Tages-SA (% VK)	Residual-SA (% VK)	Standardabweichung insgesamt (% VK)
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 (hoch)	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)

Wie ausgehend von der theoretischen Verteilung von Zähldaten zu erwarten, nimmt die Variation der TMB-Scores in der Regel mit dem Mittelwert zu. Die Variation der MSI-Scores für Stufen nahe einem MSI-Score von 50 ist größer als die Variation der MSI-Scores, die näher an 0 oder 100 liegen, was der Variabilität in der theoretischen Verteilung der Proportionsdaten entspricht. Die Residualkomponente trug sowohl bei den MSI- als auch bei den TMB-Scores am stärksten zur Gesamtvarianz bei. Hieraus folgt, dass Bediener, Chargen, Geräte und Tage die Scores nicht wesentlich beeinflussen. Allerdings sind sowohl MSI als auch TMB komplexe Biomarker, und die analytische Leistungsfähigkeit kann von Probe zu Probe variieren. Die Variation der TMB hängt daher nicht nur vom TMB-Wert ab, sondern auch von der Zusammensetzung der Varianten in der Probe, z. B. dem Variantentyp (SNV, Indel) und der VAF-Stufe (Nähe zum Einschluss-Grenzwert). Ebenso hängt die Variation der MSI nicht nur vom MSI-Wert ab, sondern auch von der Zusammensetzung der Loci in der Probe, z. B. von der Anzahl der instabilen Loci und dem Ausmaß der Instabilität an den einzelnen Loci.

Die C5- und C95-Werte um den Grenzwert von 20,00 % wurden für die MSI anhand eines Präzisionsprofils (Tabelle 74) bestimmt.

Tabelle 74 Intervalle C5–C95 für die MSI

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

Der Einfluss des Tumoranteils auf die TMB- und MSI-Werte wurde bestimmt. Bei den meisten Proben hatte ein Tumoranteil von ≥ 30 % einen vernachlässigbaren Einfluss auf die TMB-Scores oberhalb von ca. 10 Mutationen pro Megabase. Die TMB-Scores blieben bei zunehmendem Tumoranteil relativ unverändert. Bei Proben mit hoher MSI bestand eine positive, lineare Korrelation zwischen Tumoranteil und MSI-Score. Proben mit hoher MSI blieben im Durchschnitt bei der Einstufung MSI-Hoch, wenn der Tumoranteil ≥ 30 % betrug. Endometriumproben unterschieden sich deutlich von den anderen Gewebearten. Es wurde festgestellt, dass sie einen höheren Tumoranteil erforderten, um als MSI-Hoch-Proben eingestuft zu werden.

Genauigkeit für das Tumor-Profiling

Der Nachweis von Varianten durch den TSO Comprehensive (EU)-Assay wurde mit den Ergebnissen von Referenzmethoden verglichen. Kleine DNA-Varianten und TMB wurden mit einer extern validierten Exomsequenzierung der NGS, Next verglichen. Die Genamplifikationen wurden mit der gleichen

Exom-NGS-Methode oder mit der validierten dualen In-situ-Hybridisierung (DISH)-Methode für HER2-Amplifikationen verglichen. Die MSI wurde anhand eines validierten MSI-PCR-Tests ausgewertet. RNA-Spleißvarianten wurden mit einer validierten quantitativen PCR-Methode (qPCR) verglichen. ROS1- und ALK-Fusionen wurden mit validierten FISH-Assays verglichen. Alle anderen Fusionen wurden mit einem kombinierten Verfahren mit einem validierten NGS-Assay für die RNA-Exomsequenzierung (RNGS1), einem gezielten NGS-Panel (RNGS2) und digitaler Tröpfchen-PCR (ddPCR) verglichen.

Nachweis kleiner DNA-Varianten

Der Nachweis kleiner DNA-Varianten durch den TSO Comprehensive (EU)-Assay wurde mit den Ergebnissen der Exomsequenzierung (WES) verglichen, bei der das Calling von Keimbahn- und somatischen kleinen Varianten anhand von zugeordneten Tumor-Normal-Proben erfolgte. Der Vergleich zwischen kleinen Varianten, zu denen Einzelnukleotid-Varianten (SNVs), Insertionen und Deletionen zählen, erfolgte anhand von 124 Proben aus 14 verschiedenen Gewebetypen, die sowohl für TSO Comprehensive (EU) als auch für die WES gültig waren. Der Nachweis von Mehrfachnukleotid-Varianten (MNV, 2–3 bp) kann mit TSO Comprehensive (EU), jedoch nicht mit dem WES-Assay erfolgen. Daher war eine Phasierung erforderlich. TSO Comprehensive (EU) MNVs wurden als einzelne SNVs im Vergleich zur WES ausgewertet. Eine Zusammenfassung der Konkordanz auf Variantenebene einschließlich der positiven prozentualen Übereinstimmung (PPA) und der negativen prozentualen Übereinstimmung (NPA) für alle Varianten-Calls ist in Tabelle 75 dargestellt.

Tabelle 75 Zusammenfassung der Konkordanz bei kleinen, nach Keimbahn- oder somatischem Status ausgewerteten Varianten-Calls

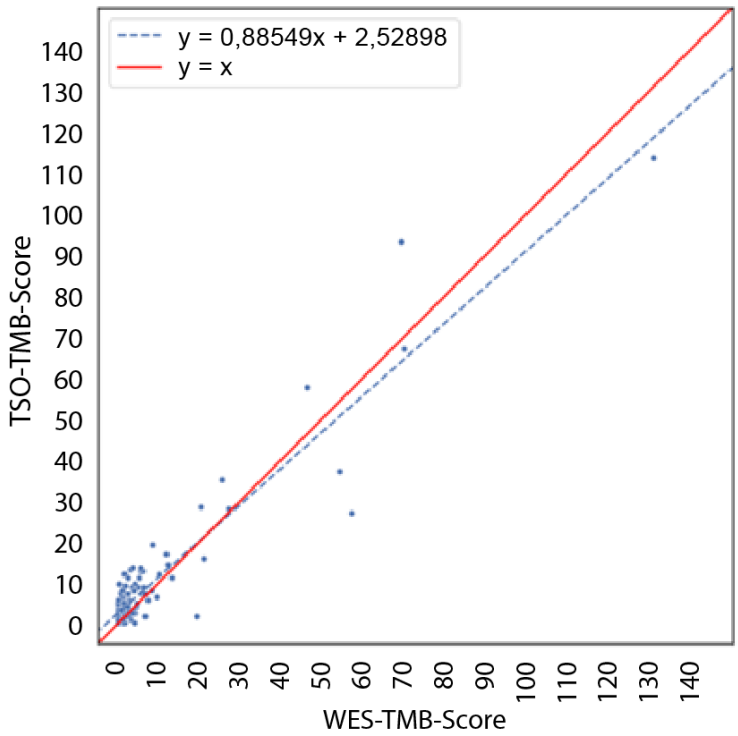
	Mit WES nachgewiesen (somatisch)	Mit WES Germline	Mit WES nicht nachgewiesen
TSO Comprehensive (EU) nachgewiesen	382	33.163	426
TSO Comprehensive (EU) nicht nachgewiesen	69	61	70.000.481
Summe	451	33.224	70.000.907
Übereinstimmung in Prozent	PPA: 85 % (382/451), 95 % KI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33.163/33.224) 95 % KI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70.000.481/70.000.907) 95 % KI: [99,999 %, 99,999 %]

Insgesamt wurden mit TSO Comprehensive (EU) 426 Varianten erkannt, die mit der WES nicht erkannt wurden. 204 (48 %) dieser Varianten wiesen Variantenallelfrequenzen auf, die unter dem Schwellenwert für die WES lagen. Von den verbleibenden potenziell falsch positiven Varianten war das Varianten-Calling mit WES unsicher. Darüber hinaus war das Calling vieler Varianten in den zugeordneten Normal-Proben mit WES sehr unsicher. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass diese Varianten im Tumor von der WES aufgrund von Tumorkontamination in der Normalprobe nicht erkannt wurden.

Nachweis der Tumormutationslast

Die TMB-Konkordanz wurde durch den Vergleich der TMB-Scores (somatische Mutationen/Megabase) zwischen WES und TSO Comprehensive (EU) für 124 Proben ermittelt, bei denen sowohl TSO Comprehensive (EU)- als auch WES-Daten verfügbar waren. Die Analyse der linearen Regression mit WES als Prädiktor ergab einen Y-Achsenabschnitt von 2,53, eine Steigung von 0,89 und einen Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,94 (Abbildung 3).

Abbildung 3 Übereinstimmung des TMB-Scores zwischen WES und TSO Comprehensive (EU)



Nachweis der Genamplifikation

Der Nachweis von Genamplifikationen mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay wurde mit den Ergebnissen desselben Exomsequenzierungs-Assays verglichen, bei dem entweder Tumor-Normal-Proben oder Nur-Tumor-Proben verwendet wurden. Insgesamt lagen 420 Proben vor (183 mit der orthogonalen Tumor-Normal-Methode und 237 mit der Nur-Tumor-Methode). Von den 420 Proben wurden 50 Proben für die Studie ausgewählt, da sie mit TSO Comprehensive (EU) oder einem Vorgänger-Assay amplifikationspositiv waren. Die Leistung dieser charakterisierten Proben wurde anhand einer mittleren Fusionsprävalenz angepasst. Die kombinierte Leistung der charakterisierten und nicht charakterisierten Proben wurde anhand eines inversen varianzgewichteten Durchschnitts ermittelt. Die Proben stammten von 14 Gewebetypen und enthielten Amplifikationen von 55 Genen. TSO Comprehensive (EU) führt Genamplifikationen für die Gene MET und ERBB2 im Bericht auf. Die Genauigkeit wurde jedoch für alle 55 Gene ermittelt. In Tabelle 76 ist eine Zusammenfassung der Genamplifikations-Calls dargestellt.

Tabelle 76 Zusammenfassung der Übereinstimmung für Genamplifikationen

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

* Konfidenzintervall berechnet durch Bootstrap.

ERBB2 (HER2)-Amplifikationen in Magen- und Brustgewebe wurden getrennt von anderen Genamplifikationen mit dualer In-situ-Hybridisierung (DISH) analysiert. Insgesamt wurden 116 Brust- und Magenproben untersucht. 64 davon wurden vorab mit IHC oder FISH als HER2-positiv bestimmt. Die Extraktion einer Probe schlug fehl, vier Proben waren nicht gültig für TSO Comprehensive (EU) und drei Proben waren nicht gültig für den DISH-Assay. 20 (18,5 %) der 108 Proben wiesen Borderline-Scores (zwischen 1,5 und 2,5) nahe dem DISH-Grenzwert von 2,0 auf. Die Konkordanzergebnisse einschließlich PPA und NPA für alle Proben sowie die Proben unter Ausschluss der Borderline-Fälle für HER2-DISH sind in Tabelle 77 dargestellt.

Tabelle 77 Zusammenfassung der Konkordanz zwischen TSO Comprehensive und HER2 DISH einschließlich HER2-Genamplifikation

HER2-Genamplifikation Alle (Brust und Magen)	HER2 DISH (amplifiziert)	HER2 DISH (nicht amplifiziert)
TSO Comprehensive (EU) Positiv	17 (einschließlich 1 mit Borderline-Score)	13 (einschließlich 1 mit Borderline-Score)
TSO Comprehensive (EU) Negativ	10 (einschließlich 6 mit Borderline-Score)	68 (einschließlich 12 mit Borderline-Score)
Übereinstimmung in Prozent (einschließlich Borderline-Fällen)	PPA: 63 % (17/27) 95 % KI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % KI: [74 %, 90 %]
Übereinstimmung in Prozent (ausgenommen Borderline-Fälle)	PPA: 80 % (16/20) 95 % KI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % KI: [72 %, 90 %]

Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität

Der Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay wurde mit den Ergebnissen eines validierten MSI-PCR-Tests verglichen, bei dem Tumor-Normal-Proben verwendet werden. Insgesamt wurden 195 Proben verglichen, die den erforderlichen Tumoranteil von ≥ 30 % (für den MS-Stable-Status) aufwiesen und aus 14 Gewebetypen stammten. MSI-PCR wertet 5 Loci aus und liefert 3 Ergebnisse: MSI-stabil (keine instabilen Loci), niedrige MSI (ein instabiler Locus) und hohe MSI (MSI-H) (mindestens zwei instabile Loci). TSO Comprehensive (EU) wertet bis zu 130 Loci mit Mikrosatelliten aus und stuft Proben nur als MS oder mit hoher MSI (≥ 20 % instabile Loci) ein. Ergebnisse mit niedriger MSI wurden mit den MS-Stable-Ergebnissen für MSI-PCR in einer Gruppe zusammengefasst. Die Analyse der Konkordanz wird in Tabelle 78 dargestellt.

Tabelle 78 Zusammenfassung der Analyse der Konkordanz zwischen TSO Comprehensive (EU) und MSI-PCR für DNA-Mikrosatelliteninstabilität

MSI-Status	PCR MSI-Hoch	PCR MSI-Niedrig	PCR MSI-Stabil
TSO Comprehensive (EU) Instabil (MSI-Hoch)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabil (MS-Stabil)	3	0	150
Summe	44	2	150
Übereinstimmung in Prozent	PPA: 93 % (41/44) 95 % KI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % KI: [95 %, > 99 %]	

Nachweis von RNA-Spleißvarianten

Die Genauigkeit bei der Erkennung von Spleißvarianten wurde durch den Vergleich der TSO Comprehensive (EU)-Ergebnisse mit qPCR-Assays für EGFRvIII und MET Exon 14-Skipping unter Verwendung von RNA berechnet, von der bekannt war, dass sie die jeweilige Spleißvariante aufweist. Die Analyse der Konkordanz wurde anhand von insgesamt 230 eindeutigen FFPE-RNA-Proben aus 14 Gewebetypen durchgeführt, für die sowohl mit TSO Comprehensive (EU) als auch mit der Referenzmethode Daten verfügbar waren. Alle Proben wurden auf MET Exon 14-Skipping getestet, während auf EGFRvIII nur im Gehirngewebe getestet wurde. Drei Proben, bei denen MET Exon 14-Skipping durch qPCR, nicht jedoch durch TSO Comprehensive (EU) erkannt wurde, wiesen einen durchschnittlichen Ct-Wert von > 37 auf und lagen unter dem LoD von TSO Comprehensive (EU). Tabelle 79 fasst die Ergebnisse der Konkordanzstudie zusammen.

Tabelle 79 Zusammenfassung der Analyse der Konkordanz zwischen TSO Comprehensive (EU) und dem qPCR-Assay für RNA-Spleißvarianten

RNA-Spleißvarianten	qPCR (positiv)	qPCR (negativ)
TSO Comprehensive (EU) Positiv (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativ (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Positiv (MET Exon 14-Skipping)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negativ (MET Exon 14-Skipping)	3	217
Summe	7	230
Übereinstimmung in Prozent	PPA: 57 % (4/7) 95 % KI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % KI: [98 %, 100 %]

Nachweis von RNA-Fusionen

Vergleich mit einem kombinierten Verfahren

TSO Comprehensive (EU) Fusionen wurden anhand eines kombinierten Verfahrens mit RNA-Exomsequenzierung mit einem NGS-Panel (RNGS1), einem gezielten NGS-Fusionspanel (RNGS2) und digitaler Tröpfchen-PCR (ddPCR) verglichen.

Beim RNGS1-Verfahren besteht eine Überschneidung hinsichtlich aller Gene, bei denen TSO Comprehensive (EU) Fusionen nachweisen kann. Die Nachweisgrenze der RNGS1-Methode war jedoch, ausgehend von der Anzahl der bestätigenden Reads, die bei den sich überschneidenden Fusions-Calls beobachtet wurden, 4- bis 8-mal so hoch wie die von TSO Comprehensive (EU). Daher wurde ein kombiniertes Verfahren angewendet, bei dem zwei zusätzliche Methoden mit höherer Sensitivität, jedoch mit geringerer Bandbreite bei Fusionen mit der Exomsequenzierungsmethode WES (RNGS1) eingesetzt wurden.

Insgesamt wurden 255 eindeutige RNA-Proben, die 14 Gewebetypen umfassten und die TSO Comprehensive (EU)-Metriken erfüllten, mit RNGS1 getestet. Zwei Proben waren für die RNGS1-Probenqualitätskontrolle ungeeignet und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Von den 82 von TSO Comprehensive (EU) bestimmten Fusionen wurden vier aufgrund von Fehlern bei der RNGS1-Probenqualitätskontrolle von der Auswertung ausgeschlossen. Sieben weitere Fusionen konnten nicht bestimmt werden, da die Targets nicht im RNGS1-Panel vorhanden waren. Von den verbleibenden 71 Fusionen, die von TSO Comprehensive (EU) bestimmt wurden, wurden neun Fusionen durch RNGS1 bestätigt. Mit RNGS1 wurden vier Fusionen bestimmt, die von TSO Comprehensive (EU) nicht erkannt wurden.

Von den 62 Fusionen mit positivem Ergebnis bei TSO Comprehensive (EU), die von RNGS1 nicht erkannt wurden, lagen 13 im Erfassungsbereich von RNGS2 und wurden mit diesem Verfahren bestätigt. Eine Fusion wurde von RNGS2 erkannt, jedoch nicht von TSO Comprehensive (EU).

Die digitale Tröpfchen-PCR wurde dann für Fusionen verwendet, die mit TSO Comprehensive (EU), jedoch nicht mit RNGS1 erkannt wurden bzw. mit RNGS1 nicht bestimmt und mit RNGS2 (49) nicht ausgewertet werden konnten. Zusätzlich wurde ddPCR für die Reevaluierung von zwei der vier von TSO Comprehensive (EU) als falsch negatives Ergebnis ermittelten Fusionen mit RNGS1 und zwei der neun bei TSO Comprehensive (EU) und RNGS1 übereinstimmenden Fusionen verwendet. Bei der Untersuchung aller Proben mit Fusionen wurden fünf Proben ohne Fusion einbezogen, um die Spezifität zu prüfen. 18 Fusionen wurden nicht mit ddPCR getestet, da keine Primer/Sonden erstellt werden konnten, weil mehrere Genpartner für die Fusion vorhanden waren oder nicht ausreichend FFPE-Material zur Verfügung stand. Für die ddPCR wurden Primer und Sonden im Hinblick auf die beobachteten Bruchpunkte im TSO Comprehensive (EU)-Assay entwickelt.

Insgesamt wurden 52 Fusionen durch ddPCR erkannt. 41 dieser Fusionen wurden durch TSO Comprehensive (EU) ebenfalls erkannt, jedoch nicht durch RNGS1 bzw. konnten mit RNGS1 nicht bestimmt werden. Neun Fusionen konnten mit ddPCR erkannt werden, jedoch nicht mit TSO Comprehensive (EU) oder RNGS1. Zwei mit ddPCR bestimmte Fusionen bestätigten die beiden übereinstimmenden Fusionen für TSO Comprehensive (EU) und RNGS1. Bei den beiden mit RNGS1 reevaluierten falsch negativen TSO Comprehensive (EU)-Ergebnissen wurde mittels ddPCR keine Fusion ermittelt. Auf der Grundlage des RNGS1-Vergleichs wurden diese jedoch als falsch negative Ergebnisse gewertet.

Von den 255 Proben wurden 35 Proben für die Studie ausgewählt, da sie mit TSO Comprehensive (EU) oder einem Vorgänger-Assay fusionspositiv waren. Die Leistung dieser charakterisierten Proben wurde anhand einer mittleren Fusionsprävalenz angepasst. Die kombinierte Leistung der charakterisierten und nicht charakterisierten Proben wurde anhand eines inversen varianzgewichteten Durchschnitts ermittelt. Die Konkordanzergebnisse für Fusionen sind in Tabelle 80 aufgeführt.

Die 66 Fusionen (54 eindeutige Fusionen), die mit dem kombinierten Verfahren übereinstimmten, repräsentierten 43 Gene im TSO Comprehensive (EU)-Panel. Allerdings können nur Fusionen aus den 23 Genen in Berichte aufgenommen werden, die in Tabelle 80 aufgeführt sind.

Tabelle 80 Zusammenfassung der Konkordanz für RNA-Fusionen

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

* Konfidenzintervall berechnet durch Bootstrap.

Vergleich mit dem FISH-Verfahren für ROS1- und ALK-Fusionen

25 NSCLC-Proben wurden mittels FISH sowohl auf ROS1- als auch auf ALK-Fusionen getestet. Fünf weitere NSCLC-Proben wurden jeweils auf ROS1-Fusionen getestet. Bei acht Proben schlug FISH für ROS1 aufgrund von ungeeignetem Gewebe fehl. Zwei ROS1-Fusionen und eine ALK-Fusion wurden sowohl durch TSO Comprehensive (EU) als auch durch FISH nachgewiesen. Es wurden keine widersprüchlichen Ergebnisse ermittelt. Tabelle 81 fasst die Konkordanzergebnisse von TSO Comprehensive (EU) und der FISH-Methode für ROS1- und ALK-Fusionen zusammen.

Tabelle 81 Zusammenfassung der Konkordanzergebnisse von TSO Comprehensive (EU) und der FISH-Methode für ROS1- und ALK-Fusionen

ALK+ROS1	FISH Positiv	FISH Negativ
TSO Comprehensive (EU) Positiv	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativ	0	44
Summe	3	44
Übereinstimmung in Prozent	PPA: 100 % (3/3) 95 % KI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % KI: [92 %, 100 %]

Probenvalidität

Die Probenvalidität (erster Versuch) wurde für 181 eindeutige RNA- und 272 eindeutige DNA-Proben aus FFPE-Blöcken gemessen, die maximal fünf Jahre alt waren. Diese Proben wurden auf der Grundlage des Gewebetyps und des verfügbaren Materials ausgewählt. Die Validität des Assays war nicht bekannt. Die Bibliothek musste die Qualitätssicherungsmetriken erfüllen, damit der Variantentyp als gültig gewertet wurde. Die Probenvalidität wurde für alle Variantentypen (kleine DNA-Varianten/TMB, MSI, Genamplifikationen,

Fusionen/Spleißvarianten) getrennt bestimmt und ist in Tabelle 82 dargestellt. Aufgrund des Transports der Reagenzien wird eine zusätzliche Verringerung der MSI-Validität um 1 % bei FFPE-Blöcken, die ≤ 2 Jahre alt sind, prognostiziert.

Tabelle 82 Probenvalidität

Variantentyp	Probenvalidität
Fusionen/Spleißvarianten (RNA)	76 %
Kleine DNA-Varianten/TMB	75 %
MSI	72 %
Genamplifikation	94 %

Zusammenfassung der analytischen Validierung für Tumor-Profiling-Claims

TSO Comprehensive (EU) ist anhand von Daten zu Nachweisgrenze, Präzision, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit analytisch für Folgendes validiert:

- Kleine DNA-Varianten: SNVs, MNVs, Insertionen und Deletionen.
- TMB
- MSI
- MET- und ERBB2 (HER2)-Genamplifikationen (siehe Tabelle 2).
- 23 Gene, bei denen Fusionen nachgewiesen werden können (siehe Tabelle 2).
- EGFR- und MET-Spleißvarianten (siehe Tabelle 2).

NTRK Klinische Leistung

Zur Validierung des TSO Comprehensive (EU)-Assays als Begleitdiagnostik (CDx) für die Auswahl von Patienten zur Behandlung mit VITRAKVI (Larotrectinib) wurden Proben von Patienten, die an den klinischen Larotrectinib-Studien (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; gemeinsam als Proben der Larotrectinib-Studien bezeichnet) bis zum Stichtag am 15. Juli 2019 teilgenommen haben, ergänzt um kommerziell erworbene Proben aus FFPE-Gewebe (formalinfixiert, in Paraffin eingebettet) im Rahmen einer Genauigkeits- und einer klinischen Bridging-Studie für den TSO Comprehensive (EU)-Assay getestet.

Bei NCT02122913 handelte es sich um eine offene Multicenter-Studie in Phase 1 zur Dosiserhöhung mit erwachsenen Patienten mit soliden Tumoren in fortgeschrittenem Stadium. Die Patienten wurden nicht auf einen positiven Befund hinsichtlich einer Krebserkrankung mit NTRK-Fusion hin ausgewählt. Im Anschluss an den Studienteil zur Dosiserhöhung wurde die Dosis bei Patienten mit dokumentiertem positiven Befund hinsichtlich einer Krebserkrankung mit NTRK-Fusion sowie bei Patienten, die nach Einschätzung des Untersuchenden von einem hochselektiven TRK-Inhibitor profitieren könnten, erhöht. NAVIGATE NCT02576431

ist eine laufende, offene Multicenter-Basket-Studie in Phase 2 mit Patienten ab 12 Jahren mit wiederkehrenden soliden Tumoren in fortgeschrittenem Stadium, bei denen durch ein externes Labor eine NTRK-Fusion ermittelt und dokumentiert wurde. SCOUT NCT02637687 ist eine laufende, offene Multicenter-Studie in Phase 1/2 mit pädiatrischen Patienten (Neugeborene und junge Patienten im Alter von bis zu 21 Jahren) mit fortgeschrittenen soliden oder primären Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS).

Von den Patienten mit positivem Befund hinsichtlich NTRK-Fusion in der Studie zum TSO Comprehensive (EU)-Assay bildeten 164 die Population mit erweiterter primärer Wirksamkeit bezüglich Larotrectinib (ePAS4).

Genauigkeitsstudie zur Erkennung von NTRK1-, NTRK2- und NTRK3-Fusionen

Die Genauigkeit des TSO Comprehensive (EU)-Assays hinsichtlich der Erkennung von NTRK-Fusionen (NTRK1, NTRK2 oder NTRK3) bei Patienten mit soliden Tumoren wurde durch die Auswertung der Konkordanz der NTRK-Fusionsergebnisse zwischen dem TSO Comprehensive (EU)-Assay sowie einer validierten orthogonalen Methode auf Grundlage der NGS nachgewiesen.

Es wurde eine retrospektive, nichtinterventionelle Studie durchgeführt. Larotrectinib-Testproben und ergänzende Proben wurden mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay an einem externen Standort sowie mit einer orthogonalen Methode in einem zentralen Labor getestet. Die Genauigkeit der mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay getesteten NTRK-Fusion-Calls wurde in Relation zur orthogonalen Methode geschätzt. Es wurden die Übereinstimmung positiver Ergebnisse in Prozent (PPA), die Übereinstimmung negativer Ergebnisse in Prozent (NPA) sowie die entsprechenden zweiseitigen 95 %Konfidenzintervalle (KI) berechnet.

Mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay und/oder der orthogonalen Methode wurden 516 Proben getestet. Von diesen Proben wurden 499 mit beiden Methoden getestet. Von den 516 Proben wurden 17 aufgrund der fehlgeschlagenen Extraktion, einer unbekannten Ursache (orthogonale Methode) bzw. einer Protokollabweichung nicht getestet. Von den 499 mit beiden Methoden getesteten Proben waren 170 (34,1 %) Larotrectinib-Testproben und 329 (65,9 %) ergänzende Proben.

In Tabelle 83 ist eine Kreuztabellierung der Ergebnisse für die 499 Proben dargestellt. Von den 499 Proben wiesen 85 Proben ungültige Ergebnisse für den TSO Comprehensive (EU)-Assay auf. Von diesen 85 Proben wiesen 53 ungültige Ergebnisse für die orthogonale Methode auf. Bei zusätzlichen sieben Proben lagen ungültige Ergebnisse für die orthogonale Methode vor. Somit wiesen 407 von 499 Proben bei beiden Methoden gültige Ergebnisse auf.

Tabelle 83 NTRK-Genauigkeitsstudie: Kreuztabellierung der Ergebnisse von TSO Comprehensive (EU) gegenüber den Ergebnissen der orthogonalen Methode hinsichtlich der Erkennung von NTRK-Fusionen

	Ergebnisse der orthogonalen Methode			
TSO Comprehensive (EU)-Assay-Ergebnis	**NTRK Fusion (positiv)**	**NTRK Fusion (negativ)**	**Ungültig**	**Summe**
NTRK-Fusion (positiv)	114	16	1	131
NTRK-Fusion (negativ)	4	273	6	283

	Ergebnisse der orthogonalen Methode			
TSO Comprehensive (EU)-Assay-Ergebnis	**NTRK Fusion (positiv)**	**NTRK Fusion (negativ)**	**Ungültig**	**Summe**
Ungültig*	4	28	53	85
Summe	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) Die ungültigen Ergebnisse des -Assays stammen von der Proben- und der Laufebene.

Die Übereinstimmungsanalysen, mit und ohne ungültige Ergebnisse für den TSO Comprehensive (EU)-Assay, sind in Tabelle 84 dargestellt. Ohne ungültige Ergebnisse für den TSO Comprehensive (EU)-Assay betrug die PPA 96,6 % (114/118; 95 % KI: 91,5 %–99,1 %) und die NPA 94,5 % (273/289; 95 % KI: 91,2 %–96,8 %).

Tabelle 84 NTRK-Genauigkeitsstudie: PPA und NPA des TSO Comprehensive (EU)-Assays verglichen mit den Ergebnissen der orthogonalen Methode für die Erkennung von NTRK-Fusionen

	Ohne ungültige Ergebnisse für den TSO Comprehensive (EU)-Assay		Mit ungültigen Ergebnissen für den TSO Comprehensive (EU)-Assay	
Maß für die Übereinstimmung	**Übereinstimmung, % (n/N)**	**95 % K***	**Übereinstimmung, % (n/N)**	**95 % K***
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 % KI nach (exakter) Berechnung gemäß Clopper-Pearson-Methode.

Klinische Bridging-Studie zur Erkennung von NTRK1-, NTRK2- und NTRK3-Fusionen

Die klinische Validität des TSO Comprehensive (EU)-Assays hinsichtlich der Erkennung von NTRK1-, NTRK2- oder NTRK3-Fusionen bei Patienten mit soliden Tumoren, die von der Behandlung mit Larotrectinib profitieren könnten, wurde in einer klinischen Bridging-Studie nachgewiesen. Ziel der Studie war die Beurteilung der klinischen Wirksamkeit des TSO Comprehensive (EU)-Assays hinsichtlich der Ermittlung von Patienten mit NTRK1-, NTRK2- oder NTRK3-Fusionen (positiver Befund) für die Behandlung mit Larotrectinib sowie die Beurteilung der Konkordanz zwischen dem TSO Comprehensive (EU)-Assay und lokalen Testmethoden (LT), die zur Bestimmung des NTRK-Fusionsstatus für klinische Studien bezüglich Larotrectinib eingesetzt wurden.

Die LT-Methoden umfassten NGS-, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-, Polymerasekettenreaktion (PCR)- sowie NanoString-Assays. NTRK-Fusionen (ETV6 NTRK3) wurden für Patienten mit infantilem Fibrosarkom bestimmt, die eine dokumentierte, mit FISH ermittelte ETV6-Translokation aufwiesen. Die meisten der 235 Patienten der Larotrectinib-Studie mit bekanntem NTRK-Fusionsstatus wurde mit NGS-Methoden getestet.

Bis zum Stichtag am 15. Juli 2019 haben 279 Patienten teilgenommen. Bei 208 der 279 Patienten lag ein positiver Befund bezüglich einer NTRK-Fusion vor. Von diesen 208 Patienten mit positivem Befund bildeten 164 die Larotrectinib-Population ePAS4.

Der primäre Endpunkt für die Larotrectinib-Wirksamkeitsanalyse war die allgemeine Ansprechrate (ORR) nach Beurteilung des unabhängigen Prüfkomitees auf Grundlage eines zusammengefassten Datensatzes aus drei klinischen Studien. Die ORR wurde anhand des Anteils der Patienten mit dem besten allgemeinen Ansprechen bezogen auf die bestätigte komplette Remission bzw. die bestätigte partielle Remission auf Grundlage der Kriterien gemäß RECIST, Version 1.1 beurteilt. In der Larotrectinib-Population ePAS4 betrug die ORR 72,6 % (95 %KI [65,1 %, 79,2 %]) und umfasste Patienten mit 16 verschiedenen Tumortypen.

Probenbilanz

Der Probensatz umfasste eine Vielzahl an Tumortypen sowie Patientenproben von Kindern und Erwachsenen.

In den Larotrectinib-Studien wurden bis zum 15. Juli 2019 279 Patienten erfasst. Von diesen war bei 235 Patienten der NTRK-Fusionsstatus bekannt. Anhand einer LT-Methode wurden 208 positive und 27 negative Befunde ermittelt. Bei 44 Patienten war der NTRK-Fusionsstatus unbekannt, da für die Teilnahme von Patienten an den Phasen zur Dosiserhöhung der Studien NCT02122913 und SCOUT NCT02637687 Tests nicht verpflichtend waren. Für die klinische Bridging-Studie mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay wurden bis zum 15. Juli 2019 erfasste Proben von Larotrectinib-Studienpatienten mit bekanntem NTRK-Fusionsstatus (208 positive Patienten und 27 negative Patienten) sowie ergänzende Proben, die durch repräsentative LT-Methoden als negativ bezüglich NTRK-Fusionen ermittelt wurden, zugelassen.

Von den 208 Proben der Larotrectinib-Studie mit positivem Befund stand bei 154 eine Probe zum Testen mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay zur Verfügung. Von diesen hatten 138 gültige Ergebnisse. Fünfzehn Proben waren aufgrund nicht bestandener Qualitätsmetriken zur Probensequenzierung ungültig und eine Probe wurde aufgrund einer Protokollabweichung nicht getestet. Von den 27 Proben der Larotrectinib-Studie mit negativem Befund stand bei 24 eine Probe zum Testen zur Verfügung. Von diesen hatten 22 gültige TSO Comprehensive (EU)-Assay-Ergebnisse. Zwei Proben waren aufgrund nicht bestandener Qualitätsmetriken zur Probensequenzierung ungültig.

Die ergänzenden Proben wurden mit einer der zwei repräsentativen LT-Methoden untersucht. Es wurden mehr als 350 Proben beschafft und auf ihren Tumoranteil geprüft. Von den ergänzenden Proben, die den Probenanforderungen entsprachen, wurden 266 erfolgreich extrahiert und mit einer repräsentativen LT-Methode als negativ hinsichtlich einer NTRK-Fusion bestätigt. Von diesen Proben standen 260 für das Testen mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay zur Verfügung, von denen wiederum 222 gültige Ergebnisse erbrachten. 38 Proben waren aufgrund nicht bestandener Metriken zur Probensequenzierung (n = 25) oder fehlerhafter Laufsequenzierung (n = 13) ungültig. Die Gesamtmenge der Proben mit negativem Befund hinsichtlich NTRK-Fusionen setzte sich aus 222 ergänzenden Proben und 22 Larotrectinib-Studienproben zusammen.

Konkordanzergebnisse

Insgesamt wurden von 437 Proben mit TSO Comprehensive (EU) getestet. Von den 208 NTRK-fusionspositiven Patienten gab es 153 mit verfügbaren Proben, die mit TSO Comprehensive (EU) getestet wurden, was 138 gültige Ergebnisse und 15 ungültige Ergebnisse ergab.

Die Übereinstimmung der TSO Comprehensive (EU)-Ergebnisse in Bezug auf die Ergebnisse der LT-Methoden (mit und ohne ungültige TSO Comprehensive (EU)-Ergebnisse) ist in Tabelle 85 dargestellt.

Tabelle 85 Klinische Bridging-Studie zu NTRK: Konkordanz zwischen dem TSO Comprehensive (EU)-Assay und den LT-Methoden hinsichtlich der Erkennung von NTRK-Fusionen

	Ohne ungültige Ergebnisse für den TSO Comprehensive (EU)-Assay		Mit ungültigen Ergebnissen für den TSO Comprehensive (EU)-Assay	
Maß für die Übereinstimmung	**% Übereinstimmung (n/N)**	**95 % KI***	**% Übereinstimmung (n/N)**	**95 % KI***
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

* Die zweiseitigen 95 %-KIs wurden nach der (exakten) Clopper-Pearson-Methode berechnet.

Die Sensitivitätsanalyse im Hinblick auf die fehlenden TSO Comprehensive (EU)-Assay-Ergebnisse belegten die Zuverlässigkeit der Übereinstimmungsanalyse. Die fehlenden TSO Comprehensive (EU)-Assay-Ergebnisse für die Patienten mit positivem Befund hinsichtlich NTRK-Fusion nach LT (n = 70) wurden mithilfe eines Modells für logistische Regression imputiert. Die Werte für die geschätzte Übereinstimmung einschließlich der imputierten Werte sind in Tabelle 86 aufgeführt.

Tabelle 86 Klinische Bridging-Studie zu NTRK: Konkordanz zwischen dem TSO Comprehensive (EU)-Assay und den LT-Methoden hinsichtlich der Erkennung von NTRK-Fusionen einschließlich der imputierten Werte für Patienten mit positivem Befund nach LT, bei denen die TSO Comprehensive (EU)-Assay-Ergebnisse fehlen

Maß für die Übereinstimmung	Übereinstimmung (%)	95 % KI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Die fehlenden TSO Comprehensive (EU) Assay-Ergebnisse für Patienten mit negativem Befund bezüglich einer Fusion nach LT wurden nicht imputiert.
* Die zweiseitigen 95 %-KIs wurden anhand der Boot-Mehrfachimputationsmethode berechnet. Bei der Boot-Mehrfachimputationsmethode handelt es sich um einen verschachtelten Bootstrap-Schritt in der Mehrfachimputation (Schomaker und Heumann 2018).

Übereinstimmungen zwischen dem TSO Comprehensive (EU)-Assay und den LTs nach Methodentyp (zum Beispiel RNA NGS, FISH) sind in Tabelle 87 aufgeführt.

Tabelle 87 Klinische Bridging-Studie zu NTRK: Konkordanz zwischen dem TSO Comprehensive (EU)-Assay und den LT-Methoden hinsichtlich der Erkennung von NTRK-Fusionen nach LT-Methodentyp

LT-Methodentyp	Maß für die Übereinstimmung	% Übereinstimmung (n/N)	95 % KI[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	nicht berechnet (1/1)	nicht berechnet
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	nicht berechnet (0/0)	nicht berechnet
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nicht berechnet: Für Untergruppen mit einer Probenanzahl < 5 werden keine statistischen Übereinstimmungsdaten berechnet.

[1] Die zweiseitigen 95 %-KIs wurden nach der (exakten) Clopper-Pearson-Methode berechnet.

[2] Umfasst NGS-Methoden, die nur RNA bzw. die DNA und RNA verwenden.

Von den 437 mit dem TSO Comprehensive (EU)-Assay getesteten Proben wiesen 24 bei den LTs widersprüchliche Ergebnisse auf: 15 waren nach den LTs positiv und nach dem TSO Comprehensive (EU)-Assay negativ, neun waren nach den LTs negativ und nach dem TSO Comprehensive (EU)-Assay positiv. Von den 24 Proben mit widersprüchlichen Ergebnissen wurden acht mit einer DNA-NGS-LT-Methode, 14 mit einer RNA-NGS-LT-Methode und zwei mit FISH getestet.

Durch eine validierte unabhängige NGS-Methode wurden die Ergebnisse des TSO Comprehensive (EU)-Assays bei 14 der 24 Proben mit widersprüchlichen Ergebnissen bestätigt. Bei den verbleibenden 10 Proben widersprachen die Ergebnisse des TSO Comprehensive (EU)-Assays sowohl denen der LT- als auch der unabhängigen NGS-Methode.

Ergebnisse bezüglich der klinischen Wirksamkeit

Innerhalb der ePAS4-Kohorte war die Wirksamkeit von Larotrectinib in der Population von Patienten, bei denen der Befund sowohl mit TSO Comprehensive (EU) als auch mit LT positiv war (97 Patienten, ORR = 78,4 %, 95 % KI [68,8 %, 86,1 %]), vergleichbar mit der Wirksamkeit von Larotrectinib in der gesamten ePAS4-Population (164 Patienten, ORR = 72,6 %, 95 % KI [65,1 %, 79,2 %]) (Tabelle 88). Von den 97 Patienten in der ePAS4, bei denen der Befund mit TSO Comprehensive (EU) positiv war, zeigten 28 (28,9 %) eine komplette Remission/eine komplette Remission nach chirurgischem Eingriff und 48 Patienten (49,5 %) eine partielle Remission.

In der Population der 13 Patienten, bei denen der Befund mit TSO Comprehensive (EU) negativ und mit LT positiv war, zeigten in Reaktion auf die Behandlung mit Larotrectinib ein Patient (7,7 %) eine komplette Remission und zwei Patienten (15,4 %) eine partielle Remission.

Tabelle 88 Klinische Bridging-Studie zu NTRK: Ergebnisse zur ORR für Patienten mit positivem Befund nach LT gegenüber Patienten mit positivem Befund nach LT und TSO Comprehensive (EU) in ePAS4

		LT Fusion Positiv N=164	**TSO Comprehensive (EU) Positiv und LT positiv N=97**	**TSO Comprehensive (EU) Negativ und LT positiv N=13**
Bestes allgemeines Ansprechen, n (%)	Komplette Remission	31 (18,9)	22 (22,7%)	1 (7,7)
	Komplette Remission nach chirurgischem Eingriff	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Partielle Remission	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabile Erkrankung	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progressive Erkrankung	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Nicht auswertbar	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Allgemeine Ansprechrate	Anzahl der Patienten, n	164	97	13
	Anzahl der Patienten mit CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 % KI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Abkürzungen: CR = komplette Remission, PR = partielle Remission, sCR = komplette Remission nach chirurgischem Eingriff.
* Das zweiseitige 95 %-Konfidenzintervall wurde nach der (exakten) Clopper-Pearson-Methode berechnet.
Bei 54 Patienten liegen keine Ergebnisse des TSO Comprehensive (EU)-Assays vor.

Die Daten aus dieser Studie belegen die Sicherheit und Wirksamkeit des TSO Comprehensive (EU)-Assays zur Ermittlung von Patienten mit soliden Tumoren und NTRK-Fusionen, die für eine Behandlung mit Larotrectinib in Frage kommen.

Quellen

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Aufgerufen am 3. Oktober 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Aufgerufen am 3. Oktober 2016.

Versionsverlauf

Überarbeitete Fassung	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200007789 v08	Mai 2025	Verweis auf Softwareversionen und Teilenummern wurde entfernt. Einschränkungen des Verfahrens wurden aktualisiert: • Informationen zum nekrotischen Gewebe. • Informationen zum MSI-Tumoranteil. Aktualisiert: • NTC-Fußnote gilt sowohl für Min- als auch für Max-Bibliotheken. • Ausrüstungs- und Materialliste, Spezifikationen der Plattenzentrifuge und Pipettenabstufungen. • SPB-Überschussberechnung von 1,05x bis 1,15x. • Terminologie für MET Exon 14 del bis MET Exon 14 Skipping. Hinzugefügt: • Hinweis für SMB in den Erfassungszielen eins und zwei. • Vorbereiten auf die Einführung in die Sequenzierung. • Zusätzliche Informationen zum Ultraschallgerät. Ergänzte Erläuterungen und aktualisierte Ergebnisse für die Leistungsmerkmale: • Störende Substanzen. • Genauigkeit für die Tumorprofilierung und Probenvalidität. • Nachweisgrenze Studie 1 und 2. • Präzision im Labor Studie 1. • Reproduzierbarkeitsstudie 2. • Stabilität der Bibliothek und Informationen zur Speicherung der Bibliothek. • Leerwertgrenze. Text und Grammatik aktualisiert.

Überarbeitete Fassung	Datum	Beschreibung der Änderung

Dokument-Nr. 200007789 v07	Januar 2024	• Informationen zu den Einschränkungen des Verfahrens hinzugefügt:
		  • Anforderungen an Proben mit nekrotischem Gewebe und Tumorgehalt für MSI-high und somatische Treibermutationen.
		  • Potenzielle Interferenzen durch Hämoglobin.
		  • Nachweisgrenzen im RET-Gen und Fusions-Calling außerhalb der annotierten Gengrenzen.
		  • Gen-Deletionen werden nicht berichtet.
		• Aktualisiert für die Verwendung mit der TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager Software Version 2.3.7.
		• Informationen zu den erforderlichen, aber nicht gelieferten Geräten und Materialien hinzugefügt, einschließlich zweier zusätzlicher Ultraschall-Konfigurationen.
		• Aktualisierte Informationen zu Proben und Probenmaterial:
		  • Anteil an nekrotischem Gewebe.
		  • Auswirkungen von Proteinase K und Hämoglobin.
		  • Lagerung von FFPE auf Trägern und gereinigter Nukleinsäure.
		• Informationen zur Verbesserung der Handhabung von Reagenzien, des Workflows und der Fehlerbehebung bei QC-Fehlern hinzugefügt.
		• Kontext hinzugefügt und Klarstellung der Leistungsmerkmale:
		  • Kreuzkontaminierung
		  • Bewertung des Kits zur Extraktion der Nukleinsäuren
		  • Störende Substanzen
		  • Stabilität der Nukleinsäure und bei FFPE auf Trägern
		  • NTRK Klinische Leistung
		• Text und Grammatik aktualisiert

Überarbeitete Fassung	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200007789 v06	Februar 2023	• Zusätzliche Erklärungen im Abschnitt „Einschränkungen“ • Sprachaktualisierungen für Konvention, Grammatik und Klarheit • Korrektur der Tabellen 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Erklärung zum Vorhandensein von Präzipitationen im FSM-Reagenz • Aktualisierung der Spezifikationen von Thermocycler und Wanne in der Ausrüstungs- und Materialliste
Dokument-Nr. 200007789 v05	September 2022	Aktualisierte Tabellen zur Reproduzierbarkeit von Studie 2
Dokument-Nr. 200007789 v04	Juni 2022	• Artikelnummern für TSO Comprehensive-Analysemodul v2.3.5 hinzugefügt • Artikelnummern für TSO Comprehensive-Analysemodul v2.3.3 entfernt • Begriffe im Abschnitt „Leerwertgrenze“ aktualisiert
Dokument-Nr. 200007789 v03	April 2022	• Informationen zu den Leistungsmerkmalen in Zusammenhang mit NTRK-Fusionen hinzugefügt • Kennzeichnung „NUR FÜR DEN EXPORT“ hinzugefügt • Erklärung zum Verwendungszweck aktualisiert und NTRK1-3-CDx-Claim hinzugefügt • Bei den Informationen zu Produktkomponenten Artikelnummern von Softwarekomponenten hinzugefügt
Dokument-Nr. 200007789 v02	Februar 2022	• Fehlerhafte Tabellenreferenz korrigiert • Einschränkungen hinsichtlich Keimbahn- oder somatischer Varianten hinzugefügt • Erläuterungen zum Nachweis von Genamplifikationen verdeutlicht
Dokument-Nr. 200007789 v01	Dezember 2021	• Einschränkungen des Verfahrens aktualisiert • Spezifikationen für Magnetstativ und Thermocycler in den Geräte- und Materiallisten präzisiert
Dokument-Nr. 200007789 v00	November 2021	Erste Version

Patente und Marken

Dieses Dokument und sein Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung des hier beschriebenen Produkts/der hier beschriebenen Produkte und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und sein Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina zu keinem anderen Zweck verwendet oder verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keinerlei Lizenzen unter seinen Patent-, Marken-, Urheber- oder Gewohnheitsrechten bzw. ähnlichen Rechten Dritter.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Verwendung des Produkts/der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGE SACHSCHÄDEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2025 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformationen

Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
92122 San Diego, Kalifornien, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

EC REP
Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
The Netherlands

Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, finden Sie im Symbolschlüssel unter „support.illumina.com“ auf der Registerkarte *Documentation* (Dokumentation) für Ihr Kit.