

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Bipacksedel

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK. ENDAST FÖR EXPORT.

Avsedd användning

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) är ett *in vitro*-diagnostiskt test som använder riktad nästa generations sekvensering för att identifiera varianter i 517 gener med hjälp av nukleinsyror extraherade från formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) tumörvävnadsprover från cancerpatienter med solida maligna tumörer med hjälp av Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrumentet. Testet kan användas för att identifiera enkelnukleotidvarianter, multinukleotidvarianter, insertioner, deletioner och genamplifieringar från DNA samt genfusioner och splicevarianter från RNA. Testet rapporterar även en tumörmutationsbörda (TMB) och mikrosatellitinstabilitetsstatus (MSI).

Testet är avsett som en produkt för behandlingsvägledande diagnostik som används för att identifiera cancerpatienter som kan hjälpas av den riktade behandlingen som listas i [Tabell 1](#) i enlighet med den godkända terapeutiska produktmärkningen. Dessutom är testet avsett att tillhandahålla tumörprofileringsinformation som ska användas av kvalificerad sjukvårdspersonal i enlighet med professionella riktlinjer och är inte avgörande eller normativt för angiven användning av någon specifik terapeutisk produkt.

Tabell 1 Indikation för produkter för behandlingsvägledande diagnostik

Tumörtyp	Biomarkers	Riktad behandling
Solida tumörer	Genfusionerna NTRK1, NTRK2 och NTRK3	VITRAKVI® (larotreklinib)

Sammanfattning och förklaring av analysen

Klinisk beskrivning

Cancer är en av de vanligaste dödsorsakerna världen över och kan uppstå i alla typer av vävnader.^{1, 2} Det är viktigt att analysera en cancers genetiska sammansättning för att kunna identifiera patienter som kan gynnas av riktade behandlingar och utveckla nya behandlingsmetoder. Flera olika gener har visat orsakssamband med cancer eller cancerprogression, och många cancerformer bär på en mängd olika varianter som påverkar de här generna och deras funktioner. Dessa varianter kan inkludera genmutationer såsom enkelnukleotidvarianter (SNV), multinukleotidvarianter (MNV), insertioner eller deletioner, genamplifieringar, genfusioner och splicevarianter. En annan konsekvens av cancergenmutationer är förekomsten av neoantigener som kan framkalla cancerspecifika immunsvär. En cancers mutationstillstånd kan representeras av TMB och MSI, vilka är genomiska signaturer som förknippas med förekomst av genomisk instabilitet och cancerneoantigener.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

TruSight Oncology Comprehensive är ett kvalitativt nästa generations sekvenseringstest (NGS) med omfattande genomisk profilering (CGP) som bedömer genomiska varianter i en omfattande panel med cancerrelaterade gener som listas i [Tabell 2](#). Analysen identifierar små varianter i alla 517 gener, samt genamplifieringar, fusioner och splicevarianter enligt [Tabell 2](#). Analysen ger kodningssekvenstäckning för alla gener utom TERT, där endast promotorregionen täcks, samt bedömer TMB-poäng och MSI-status. Analysmålen inkluderar innehåll citerat av professionella organisationer och andra viktiga amerikanska riktlinjer. Oberoende gemensamma publikationer och farmaceutisk forskning i sena stadier påverkade även TSO Comprehensive-analysens utformning.

En lista över regioner som är uteslutna från variantbestämning finns i *TruSight Oncology Comprehensive Blockeringslista (dokumentnr 200009524)* på [Illumina-supportwebbplatsen](#).

I [Tabell 2](#) identifieras fyra kategorier av varianttyp: Liten DNA-variant (S), genamplifiering (A), fusion (F) och splicevariant (Sp). Små DNA-varianter inkluderar SNV:er, MNV:er, insertioner och deletioner.

Tabell 2 TSO Comprehensive (EU) Genpanel för analys

Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp
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	5 156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5 159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp
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	5 518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3 020	H3F3A	S	384	5 520	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	5 573	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	8 352	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	5 879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp
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	1 029	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	1 050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3 717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1 108	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	8 452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

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

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU)) illumina®

Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp	Nr	Entrez-ID	Gen	Varianttyp
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	4 914	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	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Ej tillämpligt	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt

Grundläggande principer

TSO Comprehensive (EU)-analysen är ett distribuerat test som utförs manuellt med extraherad nukleinsyra som material. DNA och/eller RNA extraherat från formalinfixerad, paraffininbäddad (FFPE) vävnad används för att bereda bibliotek, som sedan anrikas för cancerrelaterade gener och sekvenseras på NextSeq

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

550Dx-instrument.

TSO Comprehensive (EU)-analysen omfattar följande processer.

- **Bibliotekspreparering och -anrikning** – 40 ng totalt RNA konverteras till dubbelsträngat komplementärt DNA (cDNA). För genomiskt DNA (gDNA) klipps 40 ng av gDNA i små fragment. Universella adaptersekvenser integreras i varje bibliotek för att möjliggöra att biblioteksfragment fångas på ytan av flödescellen under sekvensering. Adapterna inkluderar i5- och i7-indexsekvenser för att identifiera varje individuellt prov och, i fallet med bibliotek från gDNA-prover, individuella molekyler med användning av unika moleky-ID (UMI). Biblioteken anrikas sedan för de specifika generna av intresse med hjälp av en fångstbaserad metod. Biotinylerade probsekvenser som omfattar analysens målgenregioner av intresse hybridiseras till biblioteken. Proberna och de hybridiserade målbiblioteken isoleras från icke-målbibliotek genom fångst med magnetiska streptavidinpartiklar. De anrikade målbiblioteken tvättas och amplifieras. Därefter normaliseras antalet i varje anrikat bibliotek med en magnetkulebaserad metod för att säkerställa likvärdig representation i biblioteksuppsättningen för sekvensering.
- **Sekvensering och primär analys** – normaliserade, anrikade bibliotek samlas i kluster på en flödescell och sekvenseras därefter med hjälp av SBS-kemi (sekvensering genom syntes) på NextSeq 550Dx. I SBS-kemi används en metod med reversibel terminator för att identifiera enskilda, fluorescensmärkta dNTP-baser (deoxynukleosidtrifosfat) medan de inkorporeras i växande DNA-strängar. En dNTP läggs till i nukleinsyrekedjan under varje sekvenseringscykel. dNTP-märkningen fungerar som en terminator för polymerisering. Efter varje dNTP-inkorporerande används det fluorescerande färgämnet för att identifiera basen och färgämnet klyvs sedan för att möjliggöra inkorporerande av nästa nukleotid. Fyra reversibla terminator-bundna dNTP:er (A, G, T och C) förekommer som enskilda, separata molekyler. Som ett resultat minimeras inkorporeringsbiasen av naturlig konkurrens. Under den primära analysen görs basbestämningar direkt utifrån signalintensitetsmätningar under varje sekvenseringscykel, vilket resulterar i sekvensering bas för bas. Ett kvalitetsresultat tilldelas till varje basbestämning.
- **Sekundär analys** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module finns på NextSeq 550Dx-instrumentet som en del av Local Run Manager (lokal körningshanterare)-programvaran för att underlätta TSO Comprehensive (EU)-körningskonfigurationen och utföra den sekundära analysen av sekvenseringsresultaten. Sekundär analys inkluderar validering av körningsbearbetning och kvalitetskontroll, följt av demultiplexering, FASTQ-filgenerering, linjering och variantbestämning. Vid demultiplexering separeras data från biblioteksuppsättningar baserat på de unika sekvensindex som lades till under biblioteksprepareringen. Mellanliggande FASTQ-filer genereras och innehåller sekvenseringsavläsningarna för varje prov och kvalitetsresultaten, exklusive avläsningar från eventuella kluster som inte passerade filtret. Sekvenseringsavläsningarna linjeras sedan mot ett referensgenom för att identifiera ett förhållande mellan sekvenserna och tilldelas ett resultat baserat på liknande regioner. Linjerade avläsningar skrivs till filer i BAM-format. Analysprogramvaran använder separata algoritmer för bibliotek genererade från DNA- och/eller RNA-prover för att bestämma små DNA-varianter, genamplifieringar, TMB och MSI för DNA-prover samt fusioner och splicevarianter för RNA-prover. Analysmodulernas programvara genererar flera typer av utdata, inklusive sekvenseringsmått och VCF-filer (Variant Call Format). VCF-filer innehåller information om varianter som finns på särskilda positioner i ett

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

referensgenom. Sekvenseringsmått och individuella utdatafiler genereras för varje prov. Se *Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661)* för mer information om sekundär- och tertiäranalys.

- **Tertiäranalys** – Tertiär analys utförs av Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module, består av TMB- och MSI-beräkningar, bestämning med produkter för behandlingsvägledande diagnostik, tumörprofilering av varianter i två nivåer av klinisk signifikans med hjälp av en kunskapsbas (KB) och vävnadstypen, samt generering av resultatrapporter. Tumörprofilering kan också hänvisas till som omfattande genomisk profilering. De tolkade variantresultaten och resultaten för TMB- samt MSI-biomarkörer sammanfattas i TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten.

Begränsningar

Endast för *in vitro*-diagnostiskt bruk.

- Endast på ordination. Testet ska användas i enlighet med bestämmelser för kliniska laboratorier.
- Genomiska resultat listade i [Tabell 2](#) för den avsedda användningen är inte föreskrivande eller avgörande för användning av en specifik terapeutisk produkt enligt produktinformationen.
- För varianter som listas i TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten under Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (nivå 2) (Genomiska resultat med evidens för klinisk signifikans) (nivå 2) och Genomic Findings with Potential Clinical Significance (nivå 3) (Genomiska resultat med potentiell klinisk signifikans) (nivå 3) har ingen klinisk validering utförts.
- Beslut om patientvård och -behandling måste baseras på den behandlande läkarens oberoende medicinska bedömning, med hänsyn till all tillämplig information om patientens tillstånd, som patient- och familjehistoria, fysiska undersökningar, information från andra diagnostiska tester och patientens önskemål, i enlighet med vårdstandarden i ett visst samhälle.
- Kvaliteten på FFPE-prover varierar mycket. Prover som inte genomgick standardfixeringsförfaranden kanske inte genererar extraherade nukleinsyror som uppfyller analysens kvalitetskontrollkrav ([Kvalitetskontroll på sidan 79](#)). FFPE-block som har förvarats längre än fem år har visat lägre giltighet.
- Prestanda för TSO Comprehensive (EU) i prover som erhållits från patienter som har genomgått en organ- eller vävnadstransplantation har inte utvärderats.
- Stora mängder nekrotisk vävnad (≥ 23 %) kan störa TSO Comprehensive (EU)-analysens förmåga att detektera genamplifieringar och RNA-fusioner.
- Somatiska drivande mutationer kan inte detekteras tillförlitligt om tumörinnehållet (efter området) är mindre än 20 %.
- Ett resultat av mikrosatellitstabil (MS-stabil) kan vara opålitligt om tumörinnehållet är mindre än 30 %. Ett resultat av mikrosatellithög (MSI-hög) är korrekt oavsett tumörinnehåll.
- Hemoglobin associerat med vävnad minskar stödavläsningar för MET-splicevarianter.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- I starkt omarrangerade genom med deletioner och heterozygotförlust kan TSO Comprehensive (EU)-programvaran felaktigt klassificera ett DNA-prov som kontaminerat (CONTAMINATION_SCORE > 3 106 och p-värde > 0,049).
- Ett negativt resultat utesluter inte närvaron av en mutation under analysens detektionsgräns (LoD).
- Sensitiviteten för detektion av små DNA-varianter kan påverkas av:
 - Genomiskt sammanhang med låg komplexitet.
 - Ökande variantlängd.
- TMB-resultat kan vara felaktiga i följande sammanhang:
 - När tumörinnehållet når nivåer där variantallelfrekvenser (VAF) för könscellsvarianter och somatiska varianter konvergerar.
 - I populationer som inte är väl representerade i offentliga databaser.
- Genamplifieringar är de enda kopienummervarianterna som rapporteras av TSO Comprehensive (EU). Gendeletioner rapporteras inte av analysen.
- Fusionsbestämningsalgoritmer i TSO Comprehensive (EU)-analysprogramvaran kanske inte tar hänsyn till bevis från avläsningar som sträcker sig utanför annoterade gengränser.
- Sensitiviteten för detektion av fusioner kan påverkas:
 - Genom låg bibliotekskomplexitet som resulterar i minskat antal stöдавläsningar på grund av avvikelser i analysens arbetsflöde (till exempel efter blandningsstegen i [Denaturera och hybridisera RNA på sidan 44](#)).
 - När en gen omfattar båda brytpunkterna.
 - I fall där flera fusioners brytpunkter är nära varandra med en eller flera partners kan de många brytpunkterna och partnererna rapporteras som en brytpunkt och partner.
 - Med små medianinsättningsstorlekar. En minsta medianinsättningsstorlek på 80 bp krävs, men känsligheten minskar i intervallet 80–100 bp.
 - Av låg sekvenskomplexitet eller ett homologt genomiskt sammanhang för fusionsbrytpunkter.
- Upplösning av generna som är involverade i en fusion kan påverkas när fusionsbrytpunkter inträffar i genomiska regioner som innehåller överlappande gener. Analysen kommer att rapportera alla gener, avgränsade med semikolon, om flera gener överlappar en brytpunkt.
- Inkonsekvent täckning i TERT-promotorområdet kan resultera i att inget resultat rapporteras på grund av lågt djup.
- Antecknings- eller kunskapsbasfel kan orsaka ett falskt positivt eller falskt negativt resultat, inklusive listning av en variant på fel nivå (mellan Genomiska resultat med evidens för klinisk signifikans [Nivå 2] och Genomiska resultat med potentiell klinisk signifikans [Nivå 3]), eller så kan anteckningsinformationen i rapporten vara felaktig. Varianter som rapporteras i CDx-resultaten påverkas inte av antecknings- eller KB-fel. Möjligheten för fel finns från följande tre källor:
 - TSO Comprehensive (EU) variantanteckning. Det finns en felfrekvens på cirka 0,0027 %, baserat på en analys av 2 448 350 varianter från COSMIC v92, därför finns det en låg risk för fel.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

- KB-fel på grund av urvalsprocessen.
- Relevansen av KB-innehåll förändras över tid. Rapporten återspeglar kunskapsbasen vid den tidpunkt då KB-versionen hämtades.
- TSO Comprehensive (EU) är utformad för att rapportera somatiska varianter vid rapportering av varianter med evidens för klinisk signifikans eller varianter med potentiell klinisk signifikans. Som ett test med endast tumör är rapportering av (ärvda) könscellsvarianter möjlig men oavsiktlig. TSO Comprehensive (EU) använder en KB för att rapportera varianter utan att uttryckligen notera om de är könscellsvarianter eller somatiska varianter.
- Kunskapsbasen inkluderar endast terapeutiska, diagnostiska och prognostiska associationer som är relevanta för varianter som förekommer inom en fastställd solid malign tumör. Känslighets- eller cancerrisksassociationer inkluderas inte i kunskapsbasen.
- Följande tabell visar nukleotidförändringarna för tre RET-varianter som analysen inte kan detektera. Andra nukleotidförändringar för samma aminosyreförändring kan detekteras.

Tabell 3 Nukleotidförändringar för tre RET-varianter

Aminosyreförändring	Chr*	Position	Reference Allele (Referensallel)	Alternativ
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 = Kromosom

Produktkomponenter

Testet TSO Comprehensive (EU) består av följande komponenter:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU)-sats (Illuminakatalognummer 20063092) – satsen inkluderar reagens med tillräcklig volym för att generera 24 DNA-bibliotek och 24 RNA-bibliotek. Denna volym inkluderar patientprover och kontroller. Kontroller säljs separat (se [Nödvändiga reagenser som inte tillhandahålls på sidan 18](#)).
- Kunskapsbas: Uppdateras regelbundet och kan laddas ner på Illumina Lighthouse-portalen.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illuminakatalognr 20051843), som innehåller följande komponenter:
 - TSO Comprehensive Kravpaket
 - TSO Comprehensive Programvaruuppsättning
 - TSO Comprehensive USB-sats

En Illumina-servicerepresentant installerar lämplig version av Analysmodulen TSO Comprehensive (EU) på Local Run Manager (lokal körningshanterare) NextSeq 550Dx-instrument. Information om analysmodulen finns i Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661).

Reagenser

Reagenser som tillhandahålls

Följande reagenser tillhandahålls med TSO Comprehensive (EU)-satsen.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, artikelnr 20031127

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och nukleotider	-25 °C till -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, DNA polymerase, RNas H och nukleotider	-25 °C till -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och slumpmässiga hexamerer	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller reverse transcriptase	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), artikelnr 20031118

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller T4 DNA polymerase och polynukleotidkinas	-25 °C till -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och nukleotider	-25 °C till -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller ligas	-25 °C till -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider för universell sekvensering	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider för universell sekvensering	-25 °C till -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller DNA polymerase och nukleotider	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), artikelnr 20031119

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vattenbaserad lösning som innehåller magnetkulor	2 °C till 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-lösning	2 °C till 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, artikelnr 20031120

Aktiva ingredienser: Buffrad vattenbaserad lösning innehållande individuellt streckkodade oligonukleotidprimrar.



FÖRSIKTIGHET

Använd unika indexprimrar (UPxx) för RNA- eller DNA-prover. Kombinera inte CPxx- och UPxx-indexprimrar i samma bibliotek.

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

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, artikelnr 20031126

Aktiva ingredienser: Buffrad vattenbaserad lösning innehållande individuellt streckkodade oligonukleotidprimrar.



FÖRSIKTIGHET

Använd endast kombinatoriska indexprimrar (CPxx) för DNA-prover. Kombinera inte CPxx- och UPxx-indexprimrar i samma bibliotek.

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

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), artikelnr 20031123

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller formamid och salter	2 °C till 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och paramagnetiska kulor i fast fas kovalent belagda med streptavidin	2 °C till 8 °C

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxidlösning	2 °C till 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning	2 °C till 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller paramagnetiska kulor i fast fas	2 °C till 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkuptoetanol och formamid	2 °C till 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vattenbaserad lösning som innehåller magnetkulor	2 °C till 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), artikelnr 20031121

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider	-25 °C till -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel	-25 °C till -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller DNA polymerase och nukleotider	-25 °C till -15 °C
PCR Primer-cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller P5- och P7-primrar	-25 °C till -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2--merkaptoetanol och formamid	-25 °C till -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 eller PhiX)	20031492	1	10 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller PhiX genomiskt DNA	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, artikelnr 20031122

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidprobuppsättning	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidprobuppsättning	-25 °C till -15 °C

Nödvändiga reagenser som inte tillhandahålls

Pre-amplifieringsreagenser

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents (Extraherings- och reningsreagenser för DNA och RNA) – reagenskrav finns i avsnittet [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28](#).
- DNA and RNA Quantification Reagents (Kvantifieringsreagenser för DNA och RNA) – reagenskrav finns i avsnittet [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28](#).
- TruSight Oncology-kontroller:
 - TruSight Oncology DNA-kontroll (Illumina katalognr 20065041)
 - TruSight Oncology RNA-kontroll (Illumina katalognr 20065042)
- Etanol (EtOH), 100-procentig (200 proof) för molekylärbiologisk användning
- RNas-/DNas-fritt vatten

Post-amplifieringsreagenser

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) (Illumina katalognr 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-procentig (200 proof) för molekylärbiologisk användning
- RNas-/DNas-fritt vatten

Förvaring och hantering av reagenser

Följande reagensförpackningar skickas frysta. Förvara vid -25 °C till -15 °C.

Förpackning	Artikelnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amplifiering

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Förpackning	Artikelnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post-amplifiering
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplifiering



FÖRSIKTIGHET

Förvara inte reagenser i en frostfri behållare eller i kylskåpsdörrar.

Följande reagensförpackningar skickas på geldynor för att upprätthålla en temperatur på 0 °C till 10 °C. Förvara vid 2 °C till 8 °C.

Förpackning	Artikelnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post-amplifiering



FÖRSIKTIGHET

Frys inte reagenser som innehåller magnetkylor (LNB1, SPB och SMB).

- Förändringar av reagensernas utseende kan indikera en försämring av materialens kvalitet. Använd inte reagenserna om förändringar av deras utseende observeras (till exempel förändringar av reagensens färg eller grumlighet).
- FSM, SSM, ERA1-B och TCB1 kan ha produktrelaterade partiklar. Följ de specifika hanteringsriktlinjerna för varje reagens. Efter att ha utfört FSM- och SSM-blandningsstegen kommer resterande vita produktrelaterade partiklar inte att påverka prestandan.
- TSO Comprehensive (EU)-analysens stabilitet har utvärderats och prestanda för upp till fyra användningar av satsen har bekräftats. Reagenserna är stabila när de förvaras enligt de angivna temperaturerna fram till det angivna utgångsdatumet som anges på förpackningen.

Utrustning och material

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Utrustning och material för pre-amplifiering

Utrustning	Tillverkare
Ultrasonikator med tillhörande tillbehör Se Konfigurationsinställningar för ultrasonikator för DNA-fragmentering på sidan 24 .	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
En termocykler med följande specifikationer: • Ett uppvärmt lock som kan ställas in på 30 °C och 100 °C (eller stängs av om det inte kan uppnå 30 °C) • Omfattar ett temperaturintervall på 4 °C till 99 °C • Temperaturnoggrannhet på ±0,25 °C • Kompatibel med PCR-plattor med 96 brunnar, 0,2 ml • Se Ramphastighet för termocykler på sidan 26	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Provrörsskak	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikroprovsinkubatorer (2) med insatser för MIDI-plattor med 96 brunnar (2)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikrocentrifug	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Plattcentrifug med följande specifikationer: • Kompatibel med mikroplattor med 96 brunnar • Kapacitet för 280 x g (+/- 10 %)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Plattskakare med följande specifikationer: • Omloppsbanan på 2 mm • Kan skaka vid 1 200 och 1 800 rpm	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Förseglingssrulle eller -kil	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Ett magnetiskt stativ med följande specifikationer: • Utformat för precipitation/separation av paramagnetiska kulor • Magneter på sidan av stativet (inte nedtill) • Kompatibel med MIDI-plattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laboratorieutrustning

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Utrustning	Tillverkare
Precisionspipetter som kan leverera volymer mellan 2 µl och 1 000 µl med följande specifikationer: • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,02 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 1 µl eller 2 µl Pipetterna måste kalibreras regelbundet och ha en exakthet som ligger inom 5 % av angiven volym.	Valfri leverantör av laborieutrustning
Pipettstöd	Valfri leverantör av laborieutrustning
Is- eller kylblock	Valfri leverantör av laborieutrustning
Serologiska pipetter, 10 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning
Självhäftande förseglingar för plattor med 96 brunnar med följande specifikationer: • Avdragbar • Passar PCR plattor med krage och halv krage • Starkt häftämne som motstår flera temperaturförändringar inom intervallet -20 °C till 100 °C • DNas-/RNas-fria	Valfri leverantör av laborieutrustning
Mikrocentrifugrör med kapacitet på 1,7 ml, nukleasfria	Valfri leverantör av laborieutrustning
Nukleasfria reagensbehållare (engångstråg, 50 ml) (eller motsvarande)	Valfri leverantör av laborieutrustning
Koniska rör, 15 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning
Koniska rör, 50 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning
Kompatibla aerosolresistenta pipettspetsar	Valfri leverantör av laborieutrustning
Förvaringsplattor för 96 brunnar, 0,8 ml (MIDI-plattor)	Fisher Scientific, artikelnr AB-0859 eller motsvarande
PCR-plattor med 96 brunnar, kompatibla med termocykler, 0,2 ml (brunnar av polypropylen)	Valfri leverantör av laborieutrustning

Utrustning och material för post-amplifiering

Utrustning	Tillverkare
NextSeq 550Dx instrument	Illumina, katalognr 20005715
Plattcentrifug med följande specifikationer: • Kompatibel med mikroplattor med 96 brunnar • Kapacitet för 280 x g (+/- 10 %)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
En termocykler med följande specifikationer: • Uppvärm lock (100 °C) • Omfattar ett temperaturintervall på 4 °C till 99 °C • Temperaturnoggrannhet på ±0,25 °C • Kompatibel med PCR-plattor med 96 brunnar, 0,2 ml • Se Ramphastighet för termocykler på sidan 26	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Provrörsskak	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikroprovsinkubator med en insats för MIDI-plattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Värmeblock med följande specifikationer: • Temperaturintervall från 25 °C till 99 °C • Temperaturnoggrannhet på ±5 °C • Se till att mikrocentrifugrören är kompatibla med värmeblocket	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Plattskakare med följande specifikationer: • Omloppsbanan på 2 mm • Kan skaka vid 1 200 och 1 800 rpm	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikrocentrifug	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Förseglingssrulle eller -kil	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Ett magnetiskt stativ med följande specifikationer: • Utformat för precipitation/separation av paramagnetiska kulor • Magneter på sidan av stativet (inte nedtill) • Kompatibel med MIDI-plattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laboratorieutrustning

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Utrustning	Tillverkare
Precisionspipetter som kan leverera volymer mellan 2 µl och 1 000 µl med följande specifikationer: • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,02 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 1 µl eller 2 µl Pipetterna måste kalibreras regelbundet och ha en exakthet som ligger inom 5 % av angiven volym.	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Pipettstöd	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Serologiska pipetter, 10 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Självhäftande förseglingar för plattor med 96 brunnar med följande specifikationer: • Avdragbar • Passar PCR plattor med krage och halv krage • Starkt häftämne som motstår flera temperaturförändringar inom intervallet -20 °C till 100 °C • DNas-/RNas-fria	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikrocentrifugrör med kapacitet på 2 ml, nukleasfria	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikrocentrifugrör med kapacitet på 1,7 ml, nukleasfria	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Nukleasfria reagensbehållare (engångstråg, 50 ml) (eller motsvarande)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Koniska rör, 15 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Koniska rör, 50 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Kompatibla aerosolresistenta pipettspetsar	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Förvaringsplattor för 96 brunnar, 0,8 ml (MIDI-plattor)	Fisher Scientific, artikelnr AB-0859 eller motsvarande
PCR-plattor med 96 brunnar, kompatibla med termocykler, 0,2 ml (brunnar av polypropylen)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Is- eller kylblock	Valfri leverantör av laboratorieutrustning

Konfigurationsinställningar för ultrasonikator för DNA-fragmentering

DNA-fragmentering, eller -klippning, påverkar analysprestandan genom att bestämma fördelningen av fragmentstorlek, vilket i sin tur påverkar sekvenseringstäckningen. Flera fokuserade sonikeringskonfigurationer utvärderades och optimerades för TSO Comprehensive (EU)-analysen ([Tabell 4](#)).

- Klippningstiden justerades för att maximera måttet MEDIAN_EXON_COVERAGE som beskrivs i avsnittet [Kvalitetskontroll på sidan 79](#). Klippningstider (se [Tabell 4](#)) och MEDIAN_INSERT_SIZE skilde sig åt mellan konfigurationer.
- Konfigurationerna 1–4 och 6 testades med glaströr med åtta remsor. Konfiguration 5 använde ett enda glaströr. Rörens volymkapacitet visas i [Tabell 4](#).
- Optimering av konfigurationerna 3–6 (mindre vattenbadsvolymer) använde pulsering.
- Konfigurationerna 3–5 klipptes i mindre volymrör. Rörens volymkapacitet påverkar klippningsparametrarna.
- Konfiguration 4 (ledningsgivare, medelstor vattenbadsvolym, avgasat vatten) krävde en lång pulsfördröjningstid (40 sekunder) för att uppnå liknande MEDIAN_EXON_COVERAGE som konfiguration 1 och 2 vid nominell inmatning på 40 ng.
- Optimala inställningar för konfiguration 3 resulterade i en något större fragmentstorleksfördelning jämfört med de andra konfigurationerna (MEDIAN_INSERT_SIZE var ungefär 5–10 baspar större).
- Konfiguration 3 och 5 använde icke-avgasat vatten och den minsta vattenbadsvolymer.
- Konfiguration 3 och 5 behövde ökad DNA-inmatning (50 ng för konfiguration 3, 60 ng för konfiguration 5) för att uppnå liknande MEDIAN_EXON_COVERAGE i förhållande till de övriga fyra konfigurationerna, som använde den nominella inmatningen på 40 ng.
- Konfigurationerna 3 och 5 har mer skada och/eller denaturering och därför en reducerad effektiv massa av användbara dsDNA-molekyler för bibliotekspreparering.

Centrifugera klippningsrören under återhämtningsprocessen för att säkerställa att den specificerade volymen återhämtas, eftersom eventuell förlust av material kan påverka prestandan negativt.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 4 Utvärderade konfigurationer för fokuserade ultrasonikatorer

Parameter	Konfiguration					
	1	2	3	4	5	6
Givare	Linje	Punkt	Punkt	Linje	Punkt	Linje
Vattenbadsvolym	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Avgasat vatten	Ja	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
Vattenkylare	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Vattenbadstemperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Peak Incident Power (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Arbetskvot i %	30	10	30	25	20	25
Cykler per skur	200	200	1 000	1 000	1 000	600
Pulserande (10 sekunders skurar)	Nej	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Fördröjningstid för pulserande	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	10 s	40 s	10 s	10 s
Klippningstid	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Provbearbetning	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Batchstorlek	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Provstorlek för provrörsremsa med åtta rör i glas	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkelrör (50 µl)	130 µl (eller 96 mikroRÖRplatta)
Tveksamhet	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	Ej tillämpligt	3 mm Y vid 20 mm/s	Ej tillämpligt	1,5 mm Y vid 10 mm/s
Motsvarande DNA-inmatning (för medianexontäckning)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Klippningstiden på 200 sekunder består av skurar på 10 sekunder med 20 repetitioner.

² Klippningstiden på 320 sekunder består av skurar på 10 sekunder med 32 repetitioner.

Ramphastighet för termocykler

Ramphastigheten för termocykler påverkar analysens mått för kvalitetskontroll (användbara MSI-platser, medianvärdet för diskreta värden per CNV-mål, medianinsättningsstorlek (RNA)) samt stödläsningar för splicevarianter och fusioner. Optimering av termocyklernas ramphastighet rekommenderas. Till exempel justerades en testad modell från en standard (och maximal) ramphastighet på 5 °C/s till 3 °C/s för att få jämförbara resultat till andra modeller med lägre standardramphastigheter.

Insamling, transport och förvaring av prover

Följ standardförfaranden vid insamling, transport, förvaring och bearbetning av prover.

Provkrav

FFPE-vävnad

TSO Comprehensive (EU)-analysen kräver 40 ng RNA och/eller 40 ng DNA som extraherats från FFPE-vävnad. Användning av både RNA och DNA möjliggör analys av alla varianttyper som krävs. Vävnaden ska fixeras med hjälp av formalinfixativ som är lämpat för molekylära analyser (till exempel 10 % neutralbuffrat formalin). Vävnaden får inte dekalCIFieras. Vävnadsprovet ska undersökas av en patolog för att säkerställa att det är lämpligt för det här testet innan TSO Comprehensive (EU)-analysen utförs. Minst 20 % tumörinnehåll (efter område) krävs för att upptäcka somatiska drivande mutationer. Tillförlitlig detektion av MSI-status för en mängd olika prover kräver minst 30 % tumörinnehåll. Om ett prov testas med mindre än 30 % tumörinnehåll för att fastställa resultat med andra varianttyper, kan ett MS-stabilt resultat vara otillförlitligt. Ett MSI-H-resultat är korrekt oavsett tumörinnehåll.

Tumörinnehåll för genamplifieringar och RNA-varianter beror på graden av amplifiering eller uttryck (se [Tumörinnehåll på sidan 101](#)).

För en hög sannolikhet att extrahera 40 ng RNA och 40 ng DNA från en mängd olika solida vävnadstyper är den rekommenderade vävnadsvolymen $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Denna volym motsvarar ett kumulativt viabelt vävnadsområde på $\geq 200 \text{ mm}^2$ med 5 μm tjocka sektioner eller $\geq 100 \text{ mm}^2$ med 10 μm tjocka sektioner. Det kumulativa vävnadsområdet är summan av det viabla vävnadsområdet i alla sektioner som ska extraheras. Till exempel kan ett kumulativt vävnadsområde på 200 mm^2 erhållas genom att extrahera fyra 5 μm sektioner med 50 mm^2 vävnadsområde vardera eller fem 10 μm sektioner med 20 mm^2 vävnadsområde vardera. Vävnadsdöd kan minska mängden nukleinsyra. Vävnaden kan makrodissekeras för att uppnå ett önskat viabelt tumörinnehåll och på så sätt minimera risken för falskt negativa resultat.

Stora mängder nekrotisk vävnad (≥ 23 % efter område) kan störa TSO Comprehensive (EU)-analysens förmåga att detektera genamplifieringar och RNA-fusioner. Om provområdena innehåller mer än 23 % nekros i den totala vävnadsarean, måste den nekrotiska vävnaden makrodissekeras. Om laboratoriet kör RNA med analysen ska vävnad med hemoglobin undvikas eller minimeras när snitt tas från vävnadsblocket. Se [Interfererande substanser på sidan 92](#).

FFPE-vävnad som fästs på objektglas kan förvaras i upp till 28 dagar vid rumstemperatur.

Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra

- Extrahera RNA och DNA från FFPE-vävnadsprover med hjälp av kommersiellt tillgängliga extraheringssatser. Skillnader i extraktionssatser kan påverka prestandan. Mer information finns i [Utvärdering av extraktionssatser för nukleinsyra på sidan 91](#).
- Öka inte proteinas K eller motsvarande enzym under extraktion från standardkoncentrationen som tillhandahålls i en extraktionssats. Se [Interfererande substanser på sidan 92](#).
- Förvara extraherad nukleinsyra i enlighet med anvisningarna från tillverkaren av extraktionssatsen.
- Förvara extraherat DNA i upp till 28 dagar vid -25 °C till -15 °C.
- Förvara extraherat RNA i upp till 28 dagar vid -85 °C till -65 °C.
- Mät DNA och RNA inom 28 dagar från det att bibliotekspreparering påbörjas för att undvika att koncentrationen förändras över tid. Kvantifiera RNA och DNA med en fluorometrisk kvantifieringsmetod som använder nukleinsyrebindande färgämnen. Koncentrationen av nukleinsyra ska vara medelvärdet av minst tre mätningar.
- Analysen kräver 40 ng av varje RNA-prov berett i RNas-/DNas-fritt vatten (tillhandahålls inte), med en slutlig volym på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Analysen kräver 40 ng av varje gDNA-prov med en minsta extraktionskoncentration på 3,33 ng/µl. Klippning kräver en slutlig volym på 52 µl (0,77 ng/µl) med minst 40 µl TEB (tillhandahålls) som spädningsmedel.

Biblioteksförvaring

Du kan förvara bibliotek på PCR plattor med låg bindning i sju till 32 dagar, beroende på typen av bibliotek (se [Tabell 5](#)).

Tabell 5 Förvaringstider för bibliotek

Bibliotekstyp	Platta	Antal dagar	Förvaringstemperatur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C till -15 °C
Fragmenterat gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C till -15 °C
Före anrikning	ALS PCR	≤ 30	-25 °C till -15 °C
Efter anrikning	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C till -15 °C
PCR efter anrikning	PL PCR	≤ 30	-25 °C till -15 °C
Normaliserad	NL PCR	≤ 32	-25 °C till -15 °C

Varningar och försiktighetsåtgärder

Säkerhet



VARNING

Denna uppsättning reagenser innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Ventilation ska vara lämplig för hantering av farliga material i reagenser. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS på support.illumina.com/sds.html.

- Hantera alla prover som smittsamma ämnen.
- Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierock vid hantering av prov och analysreagenser. Tvätta händer noga efter att du hanterat prov och analysreagenser.

Laboratorium

- Tillämpa ett arbetsflöde med en riktning i laboratoriet för att förhindra kontaminering. Pre-amplifieringsområden och post-amplifieringsområden måste ha egen utrustning och eget material (till exempel pipetter, pipettspetsar, vortexblandare och centrifug). Förhindra amplifieringsprodukt- eller proböverföring genom att undvika att gå tillbaka till pre-amplifieringsområdet efter att du har gått vidare till post-amplifieringsområdet.
- Utför stegen Index PCR och Anrikning i ett post-amplifieringsområde för att förhindra överföring av amplifieringsprodukt.
- Biblioteksprepareringarna kräver en RNas-/DNas-fri miljö. Dekontaminera alla arbetsområden noggrant med ett RNas-/DNas-hämmande rengöringsmedel. Använd plast som är certifierad för att vara fri från DNas, RNas och humant genomiskt DNA.
- För post-amplifieringsförfaranden ska du rengöra arbetsområden och utrustning noggrant med en nyblandad 0,5-procentig NaOCl-lösning (natriumhypoklorit) före och efter varje förfarande. Lämna lösningen på ytor i 10 minuter och torka sedan noggrant rent med 70-procentig etanol eller isopropanol.
- Använd nukleasfria mikrocentrifugrör, plattor, pipettspetsar och behållare.
- Använd kalibrerad utrustning under hela analysen. Var noga med att kalibrera utrustningen efter de hastigheter, temperaturer och volymer som anges i det här protokollet.
- Använd precisionspipetter för att säkerställa korrekt reagens- och provöverföring. Kalibrera regelbundet i enlighet med tillverkarens specifikationer.
- Tillämpa följande riktlinjer när du använder pipetter med flera kanaler:

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Pipettera minst $\geq 2 \mu\text{l}$.
- Kontrollera att spetsarna sitter ordentligt och är lämpliga för pipettmärket och -modellen.
- Fixera spetsarna med en rullande rörelse för att säkerställa att alla spetsar sitter lika bra.
- Aspirera med en 90° vinkel och samma volymnivåer i alla spetsar.
- Blanda alla komponenter efter leverans genom att pipettera reaktionsblandningen upp och ner.
- Säkerställ att vätska har dispenserats fullständigt från varje spets efter dispensering.
- Var noga med att använda den utrustning som anges för analysen och att konfigurera program enligt anvisningarna.
- Angivna temperaturer för termocyklern och mikroprovsinkubatorn indikerar reaktionstemperaturer och inte nödvändigtvis utrustningens inställda temperatur.

Analys

- Undvik korskontaminering.
 - Följ god laboratoriesed vid hantering av prover och reagenser.
 - Byt till ny laboratorieutrustning för engångsbruk och nya pipettspetsar mellan prover och mellan dispensering av reagenser.
 - Använd aerosolresistenta spetsar för att minska risken för korskontaminering.
 - Tillämpa ett arbetsflöde med en riktning vid förflyttning från pre-amplifieringsområden till post-amplifieringsområden.
 - Hantera och öppna endast en indexprimer åt gången. Sätt omedelbart tillbaka locket på varje indexrör efter användning. Extra lock medföljer i satsen.
 - Byt handskar ofta och om de kommer i kontakt med indexprimrar eller prover.
 - Avlägsna oanvända indexprimerrör från arbetsområdet.
 - Överför inte reagenser tillbaka till satsrör efter att de har använts med en rörremsa, ett tråg eller en behållare.
 - Blanda prover med en pipett och centrifugera plattan när det anges.
 - Använd en skakapparat för mikropettor. Vortexblanda inte plattorna.
- Byt inte ut analyskomponenter från olika partier med reagenssatser. Information om vilket parti en reagenssats tillhör finns på etiketten på reagenssatsens förpackning och masteranalysblad.
- God laboratoriesed krävs för att förhindra att nukleaser och PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument, prover och bibliotek. Kontaminering från nukleaser och PCR-produkter kan orsaka felaktiga och otillförlitliga resultat.
- Rätt platttyp krävs för optimal analysprestanda och förvaring. Var noga med att följa anvisningarna för plattöverföring i avsnittet [Bruksanvisning på sidan 39](#).
- Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämra biblioteks kvaliteten.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Fortsätt direkt till nästa steg om ingen säker stoppunkt har specificerats i avsnittet [Bruksanvisning på sidan 39](#).
- Förvara analysreagenserna eller -komponenterna vid den angivna temperaturen i avsedda pre-amplifieringsområden och post-amplifieringsområden.
- Förvara inte reagenser i en frostfri behållare eller i kylskåpsdörrar.
- Frys inte reagenser som innehåller magnetkulor (LNB1, SPB och SMB).
- Använd inte reagenser som har förvarats på ett felaktigt sätt.
- Avvik inte från blandnings- och hanteringsförfarandena som anges för varje reagens. Otillräcklig blandning eller övervortexblandning av reagenser kan resultera i misslyckade provresultat.
- FSM, SSM, ERA1-B och TCB1 kan ha produktrelaterade partiklar. Följ hanteringsriktlinjerna för varje specifikt reagens. Efter att ha utfört FSM- och SSM-blandningsstegen kommer resterande vita produktrelaterade partiklar inte att påverka prestandan.
- Bered nya masterblandningar och kassera resterande volym efter användning.
- Bered alltid färsk 80-procentig etanol med RNase/DNase-free water för tvättsteg. Etanol kan absorbera vatten från luften, vilket kan påverka resultaten. Kassera 80-procentig etanol efter användning i enlighet med lokala, nationella och/eller federala föreskrifter.
- Överför den angivna volymen eluat. Resultaten kan påverkas om du överför mindre än den angivna volymen eluat.
- Tillämpa följande riktlinjer för ultrasonikatorer. Var noga med att följa tillverkarens anvisningar.
 - Överför gDNA till ultrasonikatorröret långsamt för att undvika att bubblor skapas. Alltför många bubblor eller en luftficka i klippningsröret kan resultera i ofullständig fragmentering.
 - Dispensera långsamt i ultrasonikatorrör och undvik stänk.
 - Undvik att vätska flyttas eller att prover går förlorade genom att inte föra pipettspetsen till ultrasonikatorrörets botten vid avlägsnande av fragmenterat DNA.
- Pipettera inte mindre än 2 µl av provet.
- Använd inte ett tråg för att dispensera reagenser för steg som kräver att mindre än 10 µl material tillsätts till varje provbrunn.
- Använd en pipett med smal spets vid överföring av fragmenterade gDNA-prover från ultrasonikatorrören till LP-plattan (bibliotekspreparering).
- Kombinera inte SUA1- och UMI-adaptrar.
- Använd SUA1-adaptrar med RNA-prover.
- Använd UMI-adaptrar med DNA-prover.
- Tilldela olika indexprimrar till varje biblioteksprov för att kunna identifiera varje bibliotek när de samlas i uppsättningar för sekvensering på en flödescell.
- Kombinera inte CPxx- och UPxx-indexprimrar i samma bibliotek.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Bristande överensstämmelse mellan proven och indexprimrarna orsakar felaktig resultatrapportering på grund av förlust av positiv providentifikation. Ange prov-ID:n och tilldela index i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module innan biblioteksprepareringen inleds. Spara prov-ID:n, indexering och plattbrunnsriktning att använda som referens vid bibliotekspreparering.
- Använd endast UPxx-index för bibliotek från RNA-prover.
- Använd UPxx-index eller CPxx-index för bibliotek från DNA-prover.
- Sekvensera högst åtta RNA-bibliotek och åtta DNA-bibliotek per flödescell. Sekvensera minst tre bibliotek. Följ riktlinjerna i avsnittet [Antalet bibliotek och att välja index på sidan 36](#).
- Efter bindingssteget i [Fånga mål 1 på sidan 60](#) och [Fånga mål 2 på sidan 64](#) ska du omedelbart fortsätta till tvättsteget för att förhindra att pelletsen torkar.
- Avlägsna all 80-procentig etanol från botten av brunnarna under tvättsteg. Kvarvarande etanol har visat sig påverka resultaten.
- Följ antalet tvättar som anges i avsnittet [Bruksanvisning på sidan 39](#) för optimala analysprestanda.
- Återsuspendera bibliotekspelleten noggrant under förfarandet [Normalisera bibliotek på sidan 70](#) för att uppnå konsekvent klusterdensitet på flödescellen.
- Rapportera omedelbart allvarliga händelser relaterade till den här produkten till Illumina och behöriga myndigheter i det land där användaren och patienten befinner sig.

Metodanmärkningar

- TSO Comprehensive (EU)-arbetsflödet kan utföras enligt följande schema:
 - Dag 1: cDNA-syntes från RNA-prover, DNA-fragmentering av gDNA-prover, bibliotekspreparering och inled hybridisering över natten (den första).
 - Dag 2: Anrikning, normalisering av anrikade bibliotek och överföring av bibliotek till NextSeq 550Dx-instrument.Om det inte är möjligt att utföra TSO Comprehensive (EU)-arbetsflödet enligt det här schemat finns det flera säkra stoppunkter angivna i protokollet. Om ingen säker stoppunkt har specificerats i protokollet fortsätter du direkt till nästa steg.
- Bibliotek från RNA- och DNA-prover kan beredas samtidigt i olika brunnar.
- Tabeller för beredning av masterblandning innefattar volymöverskott för att säkerställa att det finns tillräcklig volym för antalet prover som bearbetas.
- Använd vatten av molekylär kvalitet och som är fritt från nukleaser.
- Efter att reagens har tillsatts ska du skölja spetsen genom att aspirera och dispensera en gång i lämplig brunn på plattan, om inget annat anges i förfarandet.
- Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Reagenser, prover och bibliotek måste förvaras kallt vid vissa steg i bruksanvisningen. Detta definieras som att förvaras på is eller motsvarande.

Termocyklerprogram

- Programmera termocyklerprogram på pre-amplifierings- och post-amplifieringsutrustning innan protokollet inleds.
- Kontrollera att PCR-plattorna sitter ordentligt i termocyklern.
- Använd plattor som tillverkaren av termocyklern rekommenderar.

Försegling av plattan

- Försegla alltid plattor med en ny självhäftande plattförsegling. Återanvänd inte förseglingar.
- Försegla plattan genom att applicera det självhäftande omslaget på plattan med en förseglingsrulle eller -kil.
- Försegla alltid plattan med 96 brunnar med en ny självhäftande plattförsegling innan följande steg i protokollet:
 - Skakningssteg för platta
 - Centrifugeringssteg
 - Termocyklersteg
 - Hybridiseringssteg
 - Långtidsförvaring
- Kontrollera att kanterna och brunnarna är förseglade för att reducera risken för korskontaminering och avdunstning.
- Placera plattan på en plan yta innan du långsamt tar bort förseglingen.
- Om någon vätska eller kondens observeras på förseglingen eller plattbrunnarnas sidoväggar ska du centrifugera vid $280 \times g$ i en minut innan förseglingen bryts.
- Använd självhäftande plattförseglingar som är effektiva vid $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ och passar PCR-plattor med krage och halv krage.

Utrustning

- Kontrollera att laboratoriepersonalen är bekant med tillverkarens anvisningar för drift och underhåll av all utrustning innan analysen startas.

Platttyp och plattöverföring

- Rätt platttyp krävs för optimal analysprestanda och förvaring.
- Vid överföring av volymer mellan plattor ska du överföra den angivna volymen från varje brunn på en platta till motsvarande brunnar på målplattan.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Pipetter med flera kanaler kan användas vid överföring av prover mellan rör eller plattor med stripsformat.
- Tillämpa följande riktlinjer vid skakning av plattor.
 - Använd en plattskakare för att skaka plattor. Vortexblanda inte plattor.
 - Skaka PCR-plattor vid 1 200 rpm.
 - Skaka MIDI-plattor vid 1 800 rpm.
 - Följ tillverkarens anvisningar för att säkerställa att plattskakaren håller plattan ordentligt på plats.

Centrifugering

- När anvisningarna i protokollet instruerar att centrifugera kort ska du centrifugera vid $280 \times g$ i en minut.
- Centrifugera plattan vid $280 \times g$ i en minut om vätska observeras på förseglingen eller på en brunns sidor.

Hantering av reagenser

- Stäng alla reagensrör ordentligt omedelbart efter användning för att begränsa avdunstning och förhindra kontaminering.
- Placera reagenserna i den angivna förvaringstemperaturen igen när de inte längre behövs i ett förfarande.
- Följ reagensberedningen som kommer före varje förfarandedel i avsnittet [Bruksanvisning på sidan 39](#).
- Var noga med att bereda rätt volym masterblandning, elueringsblandning och 80-procentig etanol för antalet prover som ska bearbetas.
- Volymerna som anges i tabellerna för masterblandning och lösningar innefattar överskott.
Överskottsvolymen beräknas enligt följande:
 - [Tabell 14](#)
 - Volym för FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antalet prover} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - Volym för RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{antalet prover} + \text{kontroller}) \times (1,25)$
 - [Tabell 21](#)
 - Volym ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,20)$
 - Volym ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,20)$
 - [Tabell 29](#)
 - Volym EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
 - Volym HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
 - [Tabell 30](#)
 - Volym EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
 - Volym HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
 - [Tabell 36](#)
 - Volym LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (2,0)$
 - Volym LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (2,0)$

- [Tabell 37](#)
 - Volym EE2 = (30,4 µl) x (antalet bibliotek) x (1,25)
 - Volym HP3 = (1,6 µl) x (antalet bibliotek) x (1,25)

Adapteruppsättningar

- TSO Comprehensive (EU)-analysen inkluderar SUA1- och UMI-adaptrar.
- SUA1-adaptrar ska användas med RNA-prover. Får inte användas med DNA-prover.
- UMI-adaptrar ska användas med DNA-prover. Får inte användas med RNA-prover.

Hantera magnetkolor

- Det ingår tre typer av magnetkolor i TSO Comprehensive (EU)-analysen (SPB, SMB och LNB1). Säkerställ att rätt typ av magnetkula används under förfarandet.
- Utför rätt antal tvättar för varje typ av magnetkula.
- Kontrollera att magnetkulorna är rumstempererade innan användning.
- Blanda magnetkulorna i en minut innan användning för att säkerställa homogenitet.
- Tillämpa följande riktlinjer vid blandning av magnetkolor med en pipett:
 - Använd en pipett och spetsstorlek som är lämplig för volymen som du blandar.
 - Justera volyminställningen till cirka 50–75 % av provvolymen.
 - Pipettera långsamt utan att släppa kolven.
 - Undvik stänk och att bubblor skapas.
 - Placera pipettspetsen ovanför pelleten och dispensera direkt på pelleten för att släppa magnetkulorna från brunnen eller röret.
 - Kontrollera att pelleten är helt omgiven av lösning. Lösningen ska vara mörkbrun och ha en homogen konsistens.
 - Bedöm om det finns en kulpellet. Aspirera försiktigt den totala kullösningen av brunnen i spetsen och titta på botten av brunnarna.
- Om magnetkulorna aspireras in i pipettspetsarna under steg med magnetisk separering ska du dispensera tillbaka magnetkulorna till plattbrunnen på det magnetiska stativet. Vänta tills vätskan är klar (cirka två minuter) innan du fortsätter till nästa steg i proceduren.
- Vid tvättning av magnetkolor:
 - Använd det rekommenderade magnetiska stativet för plattan.
 - Dispensera vätska direkt på pelleten så att magnetkulorna på brunnarnas sidor blir blöta.
 - Låt plattan stå på det magnetiska stativet tills förfarandet anvisar att avlägsna den.
 - Skaka inte plattan när den står på det magnetiska stativet.
 - Rubba inte pelleten när plattan står på det magnetiska stativet.

- Vid tvättning av magnetkylor eller avlägsnande av supernatant ska du vinkla pipettspetsarna på botten av brunnarna för att undvika att ett vakuum skapas och att lösning dras in i pipettspetsens filter.

Antalet bibliotek och att välja index

Planera antalet provbibliotek och provindex för sekvenseringskörningen innan körningskonfigurationen. Positiva kontroller innefattas i följande riktlinjer om provantal, medan negativa kontroller (NTC) inte gör det. NTC måste läggas till den planerade körningen som ett extra prov.

För TSO Comprehensive (EU), följ riktlinjerna i [Tabell 6](#) och [Tabell 7](#) för att bestämma antalet RNA- och/eller DNA-bibliotek som ska sekvenseras i en flödescell. Se [Tabell 6](#) om du sekvenserar RNA- eller DNA-bibliotek separat. Se [Tabell 7](#) om du sekvenserar RNA- och DNA-bibliotek i samma flödescell.

Tabell 6 Sekvensering av RNA- eller DNA-bibliotek

Bibliotekstyp	Minimum*	Högst*
Endast RNA	3	16
Endast DNA	3	8

* NTC:er bidrar inte till plexiteten.

Tabell 7 Sekvensering av RNA- och DNA-bibliotek i samma flödescell

Bibliotekstyp	Minimum*	Högst*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC:er bidrar inte till plexiteten.

För optimal reagensanvändning vid sekvensering av DNA- och RNA-bibliotek med TSO Comprehensive (EU) på NextSeq 550Dx-instrument, sekvensera 8 RNA bibliotek och 8 DNA-bibliotek per flödescell.

Indexprimrar identifierar varje unikt prov så att bibliotek kan samlas i uppsättningar för sekvensering på en flödescell. Kompatibla indexkombinationer visas på skärmen Create Run (Skapa körning) under körningskonfigurationen i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Tillsätt indexprimern i varje provbibliotek under biblioteksprepareringen. *Använd olika indexprimerblandningar för varje provbibliotek.*

Kontrollera att de indexprimrar som du använder med prover överensstämmer med de index som du valde i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. *Bristande överensstämmelse orsakar felaktig resultatrapportering på grund av förlust av positiv providentifikation.*

Det finns två typer av index i TSO Comprehensive (EU)-analysen.

- UPxx-index** – använd UPxx-index för bibliotek från RNA- eller DNA-prover.
- CPxx-index** – använd CPxx-index för bibliotek från DNA-prover. Använd inte CPxx-index för bibliotek från RNA-prover eller om du sekvenserar totalt endast tre DNA-bibliotek.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Följande krav gäller vid sekvensering av endast tre bibliotek:

- Biblioteken måste bestå av antingen DNA eller RNA.
- Använd inte CPxx-indexuppsättningar.
- En av följande UPxx-indexuppsättningar krävs för tillräcklig mångfald:
 - UP01, UP02 och UP03
 - UP04, UP05 och UP06
 - UP07, UP08 och UP09
 - UP10, UP11 och UP12

Till exempel tilldelas det första biblioteket UP01, det andra biblioteket UP02 och det tredje biblioteket UP03.

TruSight Oncology Kontroller

TSO Comprehensive (EU) kräver TruSight Oncology Controls, som består av TruSight Oncology DNA-kontrollen och TruSight Oncology RNA-kontrollen som positiva kontroller. Inkludera TruSight Oncology DNA-kontrollen för varje DNA-sekvenseringskörning och TruSight Oncology RNA-kontrollen för varje RNA-sekvenseringskörning inom en särskild bibliotekspreparering (inkludera även kontroller för kombinerade DNA- och RNA-körningar). En unik positiv kontroll bereds för varje planerad sekvenseringskörning. För mer information, se Bipacksedel för TruSight Oncology Controls (dokumentnr 200009919).

Den positiva kontrollinmatningsmängden är 40 ng för DNA och RNA.

Inkludera en lämplig NTC i varje RNA- och DNA-bibliotekspreparering. NTC sekvenseras flera gånger inom en bibliotekspreparering. Följ dessa riktlinjer för TruSight Oncology Controls:

- Bearbeta positiva kontroller och kontroller utan mall som är identiska med proven.
- Använd TEB för DNA NTC.
- Använd DNas-/RNas-fritt vatten för RNA NTC.
- De positiva kontrollerna inkluderas i maximikravet för bibliotek.
- NTC:er inkluderas inte i minimikravet för bibliotek.
- Använd UP-index för NTC vid sekvensering av endast tre bibliotek.
- Eftersom NTC sekvenseras flera gånger kan inte de index som väljs för den här kontrollen upprepas i biblioteksprepareringen.

I följande tabeller visas exempel på plattlayouter för bibliotekspreparering. Varje numrerad kolumn representerar en sekvenseringskörning. När DNA- och RNA-bibliotek sekvenseras tillsammans representerar varje motsvarande uppsättning kolumner en sekvenseringskörning (t.ex. kolumn 1 och kolumn 7). NTC sekvenseras för varje kolumn eller uppsättning kolumner.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 8 Bibliotekspreparering för en körning med sex patientprover

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

Tabell 9 Bibliotekspreparering för tre körningar med 20 patientprover

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

Bruksanvisning

En överblick av TSO Comprehensive (EU)-arbetsflödet visas i [Figur 1](#) och [Figur 2](#).

Arbetsflöde för bibliotekspreparering

[Figur 1](#) visar arbetsflödet för bibliotekspreparering för TSO Comprehensive (EU). Bibliotek från RNA- och DNA-prover kan beredas samtidigt i olika brunnar. Positiva kontroller och kontroller utan mall bearbetas identiskt med prover. Säkra stoppunkter mellan stegen är markerade.

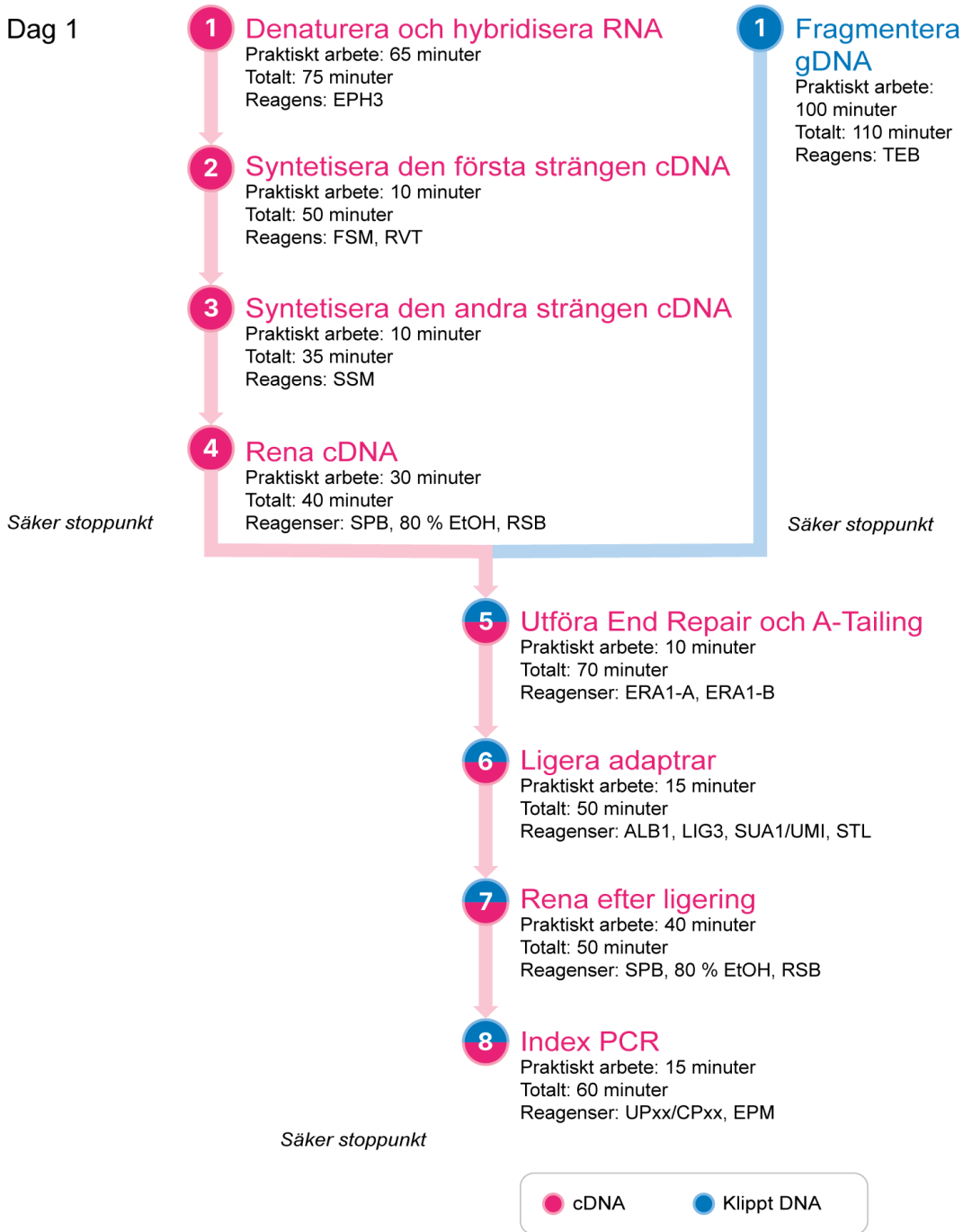
Innan du startar protokollet, ange körnings- och provinformation i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Se *Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module* (dokumentnr 200008661).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

illumina®

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

Dag 1

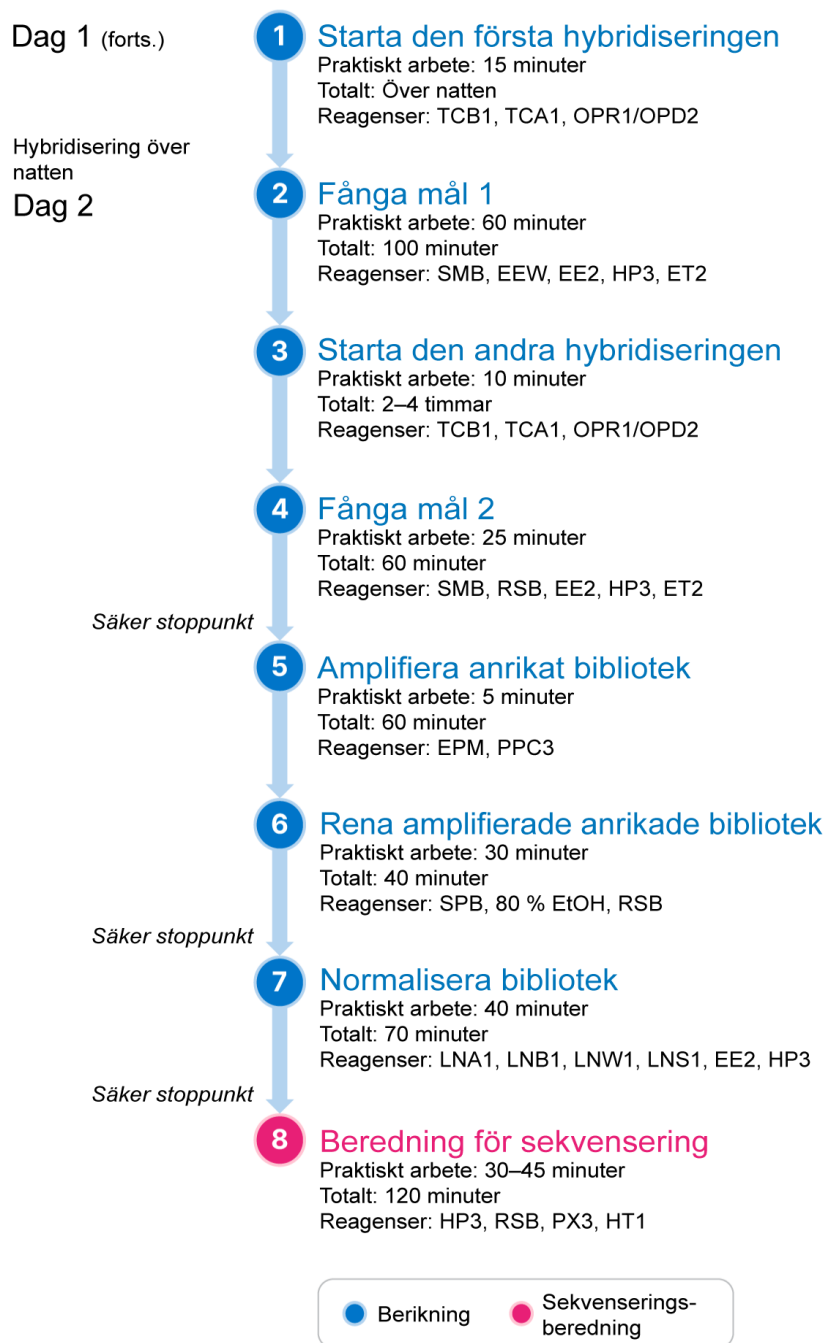


* Tiderna för praktiskt arbete och totala tider är ungefärliga.

Anrikningsarbetsflöde

Figur 2 visar anrikningsarbetsflödet för TSO Comprehensive (EU). Säkra stoppunkter mellan stegen är markerade.

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



Programmera termocykler

Spara följande program på termocykler för pre- och post-amplifiering innan analysen startas.

Tabell 10 Termocyklerprogram för pre-amplifiering

Förfarandesteg	Programnamn	Locktemperatur	Reaktionsvolym	Termocyklerparametrar
Denaturera och hybridisera RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C i fem minuter • 4 °C i en minut • Förvara vid 4 °C
Syntetisera den första strängen cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C i 10 minuter • 42 °C i 15 minuter • 70 °C i 15 minuter • 4 °C i en minut • Förvara vid 4 °C
Syntetisera den andra strängen cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C i 25 minuter • 4 °C i en minut • Förvara vid 4 °C

OBS! Inaktivera alternativet med förvämt lock om locktemperaturen för 2ndSS inte kan ställas in till 30 °C.

Tabell 11 Termocyklerprogram för post-amplifiering

Förfarandesteg	Programnamn	Locktemperatur	Reaktionsvolym	Termocyklerparametrar
Index PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 cykler av: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i fem minuter • Håll vid 10 °C
Utföra den första hybridiseringen	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minuter • 85 °C i två minuter och 30 sekunder • 75 °C i två minuter och 30 sekunder • 65 °C i två minuter och 30 sekunder • Förvara vid 57 °C i 8 till 24 timmar

Förfarandesteg	Programnamn	Locktemperatur	Reaktionsvolym	Termocyklerparametrar
Utföra den andra hybridiseringen	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minuter • 85 °C i två minuter och 30 sekunder • 75 °C i två minuter och 30 sekunder • 65 °C i två minuter och 30 sekunder • Förvara vid 57 °C i 1,5 till 4 timmar
Amplifiera anrikat bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 18 cykler av: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i fem minuter • Håll vid 10 °C

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.



FÖRSIKTIGHET

Alla förfaranden i arbetsflödet kräver en RNas-/DNas-fri miljö.

1. Dekontaminera alla arbetsområden noggrant med ett RNas-/DNas-hämmande rengöringsmedel.
2. Kontrollera att termocyklerprogrammen för pre-amplifiering är konfigurerade. Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
3. Följ tillverkarens anvisningar för att konfigurera ultrasonikatorn.
4. Fortsätt direkt till [Fragmentera gDNA på sidan 49](#) om du endast ska bearbeta DNA-prover.
5. Ta fram RNA-kontroller från förvaringen.
6. Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (artikelnr 20031127)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
EPH3	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Denaturera och hybridisera RNA
FSM	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Syntetisera den första strängen cDNA

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
RVT	-25 °C till -15 °C	Förvara kallt.	Syntetisera den första strängen cDNA
SSM	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Syntetisera den andra strängen cDNA

Tabell 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (artikelnr 20031119)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
SPB (ljusgrön märkning)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Rena cDNA
RSB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Rena cDNA

Denaturera och hybridisera RNA

I den här processen denatureras RNA och primrar med slumpmässiga hexamerer som förberedelse för cDNA-syntetiseringen.

Beredning

- Bered följande reagenser.
 - EPH3 – ställ undan.
 - FSM – vortexblanda. Centrifugera kort och pipettera därefter för att blanda.
Reagensen kan innehålla vita produktrelaterade partiklar. Ingen användaråtgärd krävs.
Produktprestandan påverkas inte.
 - RVT – centrifugera kort och pipettera därefter för att blanda. Förvara kallt.

OBS! RVT är en trögflytande lösning. Minimera bubbelbildning under pipettering.

- Kombinera följande volymer i ett mikrocentrifugrör för att bereda en FSM+RVT-masterblandning.

Tabell 14 FSM+RVT-masterblandning*

Masterblandningskomponent	4 bibliotek (µl)	8 bibliotek (µl)	16 bibliotek (µl)	24 bibliotek (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Beräkningar finns i avsnittet [Hantering av reagenser på sidan 34](#).

- Pipettera tio gånger för att blanda.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

4. Förvara FSM+RVT-masterblandningen kallt tills du når avsnittet [Syntetisera den första strängen cDNA](#) på sidan 45.

Förfarande

1. Förvara extraherade RNA-prover och RNA-kontroller kallt under upptining. Bearbeta RNA-kontroller som prover för resten av protokollet.
2. Förvara RNA kallt när det inte används. Mer information om kvantifiering av prover finns i avsnittet [Provkrav](#) på sidan 27.
3. Pipettera varje RNA-prov tio gånger för att blanda.
4. Använd RNase/DNase-free water för att bereda 40 ng av varje RNA-prov i den slutliga volymen på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
För RNA-kontroller ska du använda den koncentration som är angiven på rörets märkning.
5. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med CF (cDNA-fragment).
6. Tillsätt 8,5 µl av varje RNA-prov i en unik brunn på PCR-plattan CF.
7. Kontrollera att provplattslayouten och indexen för varje prov överensstämmer med körningen som planerades i Analysmodulen TSO Comprehensive (EU) under körningskonfigurationen.
8. Vortexblanda EPH3 och centrifugera sedan kort.
9. Tillsätt 8,5 µl EPH3 i varje provbrunn.
10. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan CF.



FÖRSIKTIGHET

Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.

11. Skaka vid 1 200 rpm i en minut.
12. Centrifugera vid 280 × g i en minut.
13. Placera på termocyklern och kör LQ-RNA-programmet.
Se [Programmera termocykler](#) på sidan 42.
14. Vänta en minut när proven når 4 °C. Fortsätt omedelbart till nästa steg.

Syntetisera den första strängen cDNA

I den här processen används omvänd transkription av RNA-fragmenten som är primade med slumpmässiga hexamerer till den första strängen cDNA med reverse transcriptase.

Förfarande

1. Avlägsna PCR-plattan CF från termocyklern.
2. Pipettera tio gånger för att blanda FSM+RVT-masterblandningen. Se till att FSM+RVT-blandningen är helt homogen.
3. Tillsätt 8 µl FSM+RVT-masterblandning i varje provbrunn.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

4. Pipettera tio gånger för att blanda.
5. Kassera resterande FSM+RVT-masterblandning.
6. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan CF.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
7. Skaka vid 1 200 rpm i en minut.
8. Centrifugera vid $280 \times g$ i en minut.
9. Placera på en termocykler och kör 1stSS-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
10. Fortsätt omedelbart till nästa steg när proven når 4 °C.
De första strängproven kan förvaras vid 4 °C i upp till fem minuter.

Syntetisera den andra strängen cDNA

I den här processen avlägsnas RNA-mallen och dubbelsträngat cDNA syntetiseras.

Beredning

1. Förbered SSM:
 - a. Vänd tio gånger för att blanda.
 - b. Centrifugera kort. Reagensen kan innehålla vita produktrelaterade partiklar. Ingen åtgärd krävs.
Produktprestandan påverkas inte.

Förfarande

1. Avlägsna PCR-plattan CF från termocyklern.
2. Tillsätt 25 µl SSM i varje provbrunn.
3. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan CF.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
4. Skaka vid 1 200 rpm i en minut.
5. Centrifugera vid $280 \times g$ i en minut.
6. Placera på en termocykler och kör 2ndSS-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
7. Vänta en minut och fortsätt sedan omedelbart till nästa steg när proven når 4 °C.

Rena cDNA

I den här processen används SPB för att rena cDNA från oönskade reaktionskomponenter. Magnetkulorna tvättas två gånger med ny 80-procentig EtOH. cDNA elueras med RSB.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - SPB – kontrollera att magnetkulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
2. Bered ny 80-procentig EtOH i ett koniskt rör på 15 ml eller 50 ml enligt följande.

Tabell 15 Förbered ny 80-procentig EtOH

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

3. Vortexblanda ny 80-procentig EtOH.
4. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med BIND1 (cDNA-bindning).
5. Täck och ställ undan.
6. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Avlägsna PCR-plattan CF från termocyklern.
2. Vortexblanda SPB i en minut för att återsuspendera magnetkulorna.
3. Tillsätt omedelbart 90 µl SPB i varje provbrunn på MIDI-plattan BIND1.
Om du använder ett tråg för att dispensera SPB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,15 för att alikvotera tillräckligt med material per prov. Kassera eventuellt kvarvarande material när SPB har tillsatts i varje provbrunn.
4. Överför hela volymen (50 µl) av varje prov från PCR-plattan CF till motsvarande brunnar på MIDI-plattan BIND1.
5. Kassera den tomma PCR-plattan CF.
6. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BIND1.
Försegla kanter och brunnar helt.
7. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
8. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
9. Placera MIDI-plattan BIND1 på ett magnetiskt stativ i fem minuter.
10. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje provbrunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

1. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
 - a. Låt BIND1 MIDI-plattan vara kvar på det magnetiska stativet och tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH i varje brunn.
 - b. Vänta i 30 sekunder.
 - c. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje provbrunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta magnetkulorna en **andra** gång.
3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EtOH från varje brunn.
4. Kassera den 80-procentiga EtOH som inte har använts.

Eluering

1. Avlägsna BIND1 MIDI-plattan från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 22 µl RSB i varje provbrunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BIND1.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
6. Inkubera i rumstemperatur i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med PCF (renade cDNA-fragment).
Om du stannar vid **SÄKER STOPPUNKT på sidan 48** ska du använda en PCR-platta.
9. Överför 20 µl eluat från varje provbrunn på MIDI-plattan BIND1 till motsvarande brunnar på PCF-plattan.
10. Kassera den tomma MIDI-plattan BIND1.
11. Tillsätt 30 µl RSB i varje provbrunn på PCF-plattan.
12. Blanda genom att pipettera tio gånger.
13. Applicera självhäftande plattförsegling på PCF-plattan och förvara den kallt.
14. Ställ tillbaka EPH3, FSM, RVT och SSM på förvaringsplatsen.
15. Om du endast bearbetar prover från RNA (cDNA) och inte stannar vid den säkra stoppunkten ska du fortsätta till **Utföra End Repair och A-Tailing på sidan 52**.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan PCF vid 280 × g i en minut och förvara den vid -25 °C till -15 °C i upp till sju dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

1. Ta fram DNA-kontroller från förvaringen.
2. Avlägsna reagensröret från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (artikelnr 20031119)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
TEB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fragmentera gDNA

Fragmentera gDNA

I den här processen fragmenteras gDNA och dsDNA-fragment med 3' eller 5' överhäng genereras.

Beredning

1. Följ rekommendationerna för [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28](#) för att kvantifiera prover.
2. Förbered TEB – Blanda genom att vända upp och ned eller vortexblanda.

Förfarande

Bereda plattan

Välj ett av följande alternativ för att bereda plattan:

- Bearbeta gDNA-prover samtidigt som cDNA-prover på MIDI-plattan PCF.
 - a. Märk MIDI-plattan PCF med LP (bibliotekspreparering).
 - b. Förvara kallt och ställ undan tills den ska användas i processen som beskrivs i avsnittet [Överföra fragmenterat DNA på sidan 50](#).
- Bearbeta gDNA-prover samtidigt som cDNA-prover och PCR-plattan PCF är fryst.
 - a. Tina PCR-plattan PCF till rumstemperatur.
 - b. Centrifugera vid 280 × g i en minut.
 - c. Pipettera tio gånger för att blanda.
 - d. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med LP (bibliotekspreparering).
 - e. Överför hela volymen på 50 µl av varje prov från PCR-plattan PCF till motsvarande brunnar på MIDI-plattan LP.
 - f. Kassera PCR-plattan PCF.
 - g. Applicera självhäftande plattförsegling och förvara kallt tills du når avsnittet [Överföra fragmenterat DNA på sidan 50](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- Bearbeta endast gDNA-prover.
 - a. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med LP (bibliotekspreparering).
Om du stannar vid [SÄKER STOPPUNKT på sidan 51](#) ska du använda en PCR-platta.
 - b. Täck plattan och ställ undan tills den ska användas i [Överföra fragmenterat DNA på sidan 50](#).

Späda ut gDNA

1. Tina gDNA-prover och DNA-kontroller i rumstemperatur.
2. Pipettera varje gDNA-prov tio gånger för att blanda.
3. Centrifugera röret kort för att samla in droppar.
4. Blanda genom att vända på eller vortexblanda TEB.
5. Använd TEB för att förbereda varje gDNA-prov i en slutlig volym på 52 µl. Se följande tabell för inmatningsmängder och minsta koncentrationer baserat på provtyp.
 - Analysen kräver en lägsta extraktionskoncentration för att tillåta minst 40 µl TEB av volymen på 52 µl.
 - För DNA-kontroller ska du använda den koncentration som är angiven på rörets märkning.
 - Pipettera inte mindre än 2 µl prov i den här spädningen för att undvika att prov går förlorat.

Provtyp	Inmatningsmängd (ng)	Minsta koncentration (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontroll	40	Se rörets etikett

Fragmentera

1. Tillsätt 52 µl av varje gDNA-prov i en separat brunn för ultrasonikorröret.



FÖRSIKTIGHET

Tillsätt gDNA i röret långsamt och kontrollera att det inte förekommer några bubblor i röret eller några luftfickor längst ner i röret. Mer information finns i avsnittet [Analys på sidan 30](#) och i tillverkarens anvisningar.

2. Registrera remsans riktning.
3. Fragmentera gDNA till fragment med ultrasonikatorn.

Överföra fragmenterat DNA

1. Kontrollera att provplattans layout och index för varje prov matchar den körning du väljer för analys med Analysmodulen TSO Comprehensive (EU).
2. Följ ultrasonikortillverkarens anvisningar för att återställa provet.
Centrifugering behövs för att slå samman provet i vissa typer av ultrasonikorrör.
3. För varje fragmenterat gDNA-prov ska du använda en pipett med smal spets för att göra tre överföringar på 16,7 µl till en tom brunn på MIDI-plattan LP.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina** Oncology Comprehensive (EU))

4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du applicera en självhäftande plattförsegling på LP PCR-plattan och centrifugera vid $280 \times g$ i en minut. Förvara vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

Kontrollera att termocyklerprogrammen för post-amplifiering är konfigurerade. Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).

1. Förbered en ishink eller motsvarande.
2. Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (artikelnr 20031118)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
ERA1-A	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara kallt.	Utföra End Repair och A-Tailing
ERA1-B	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Utföra End Repair och A-Tailing
ALB1	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
LIG3	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara kallt.	Ligera adaptrar
SUA1 (blått lock)	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
UMI (vitt lock)	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
STL	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
EPM	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara kallt.	Index PCR

Tabell 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (artikelnr 20031119)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
SPB (ljusgrön märkning)	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Rena efter ligering
RSB	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara i rumstemperatur.	Rena efter ligering

Tabell 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (artikelnr 20031120)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
UPxx	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina lämpliga indexprimerrör till rumstemperatur.	Index PCR

Tabell 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (artikelnr 20031126)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
CPxx	-25 °C till -15 °C	Tina lämpliga indexprimerrör till rumstemperatur.	Index PCR

Utföra End Repair och A-Tailing

I den här processen repareras överhängen som uppstår vid fragmentering till ändar med överhängande A-svans med hjälp av en End Repair A-Tailing-masterblandning (ERA1).

3 tum till 5 tum exonukleasaktiviteten i den här blandningen avlägsnar 3 tum överhängen och 5 tum till 3 tum polymerasaktiviteten fyller i 5 tum överhängen. 3'-ändarna får A-svansar under den här reaktionen för att förhindra att de ligerar till varandra under adapterligeringsreaktionen.

Beredning

- Förvärm två mikroprovsinkubatorer med MIDI-insatser för värmeblock enligt följande.
 - Förvärm en mikroprovsinkubator till 30 °C.
 - Förvärm en mikroprovsinkubator till 72 °C.
- Bered följande reagenser.
 - ERA1-A – centrifugera kort och pipettera därefter för att blanda. Förvara kallt.
 - ERA1-B – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
Kontrollera om det förekommer precipitat. Om precipitat förekommer ska du värma röret till 37 °C och därefter pipettera för att blanda tills precipitatet har löst upp sig.

- Bered ERA1-masterblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 21 ERA1 Mastermix*

Masterblandningskomponent	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
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

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Beräkningar finns i avsnittet [Hantering av reagenser på sidan 34](#).

- Pipettera långsamt tio gånger för att blanda och centrifugera därefter kort. Förvara ERA1-masterblandningen kallt.
- Välj ett av följande alternativ för att bereda plattan:
 - Bered enligt följande om proverna finns på en MIDI-platta.
 - Märk om MIDI-plattan med LP2 (bibliotekspreparering 2).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

- b. Om vissa prover finns på olika MIDI-plattor flyttar du alla prover till separata brunnar på samma MIDI-platta i enlighet med plattlayouten.
- Bered enligt följande om plattan är fryst.
 - a. Tina PCR-plattan PCF eller PCR-plattan LP till rumstemperatur.
 - b. Centrifugera plattan vid $280 \times g$ i en minut.
 - c. Pipettera tio gånger för att blanda.
 - d. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med LP2 (bibliotekspreparering 2).
 - e. Överför hela volymen på 50 μ l av varje prov från PCR-plattan PCF eller PCR-plattan LP till motsvarande brunnar på MIDI-plattan LP2.
 - f. Kassera PCR-plattan PCF eller PCR-plattan LP.

Förfarande

1. Tillsätt 10 μ l ERA1-masterblandning i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2.
2. Kassera resterande ERA1-masterblandning.
3. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
4. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
5. Inkubera i den förvärmade mikroprovsinkubatorn vid 30 °C i 30 minuter.
6. Överför omedelbart till en andra förvärmad mikroprovsinkubator.
7. Inkubera vid 72 °C i 20 minuter.
8. Håll MIDI-plattan LP2 kall i fem minuter.

Ligera adaptrar

I den här processen ligeras adaptrar till ändarna av cDNA- och/eller gDNA-fragmenten.

TSO Comprehensive (EU)-analysen inkluderar SUA1- och UMI-adaptrar.

- Använd SUA1-adaptrar med RNA-prover.
- Använd UMI-adaptrar med DNA-prover.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - ALB1 – vortexblanda i minst 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - LIG3 – centrifugera kort och pipettera därefter för att blanda. Förvara kallt.
 - SUA1 – vortexblanda i minst 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - UMI – vortexblanda i minst 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - STL – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.

Förfarande

1. Avlägsna MIDI-plattan LP2 från isen eller motsvarande.
2. Tillsätt 60 µl ALB1 i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2. ALB1 är en trögflytande lösning. Pipettera långsamt för att minimera bubbelbildning.
3. Tillsätt 5 µl LIG3 i varje provbrunn.
4. Tillsätt adaptrar enligt följande.
Kombinera *inte* olika typer av adaptrar.
 - **[RNA-provbrunnar]** – Tillsätt 10 µl SUA1 (blått lock) i varje prov från RNA.
 - **[DNA-provbrunnar]** – Tillsätt 10 µl UMI (vitt lock) i varje prov från DNA.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Inkubera i rumstemperatur i 30 minuter.
8. Vortexblanda STL och centrifugera sedan kort.
9. Tillsätt 5 µl STL i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2.
10. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
11. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.

Rena efter ligering

I den här processen används SPB för att rena de adapterligerade cDNA- eller gDNA-fragmenten och oönskade produkter avlägsnas. Magnetkulorna tvättas två gånger med ny 80-procentig etanol. De adapterligerade proven elueras med RSB.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - SPB – kontrollera att magnetkulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
2. Bered ny 80-procentig EtOH i ett koniskt rör på 15 ml eller 50 ml.

Tabell 22 Förbered färsk 80-procentig etanol

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

3. Vortexblanda ny 80-procentig EtOH.

4. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Vortexblanda SPB i en minut för att återsuspendera magnetkulorna.
2. Tillsätt omedelbart 112 µl SPB i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2.
Om du använder ett tråg för att dispensera SPB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,15 för att alikvotera tillräckligt med material per prov. Kassera eventuellt kvarvarande material när SPB har tillsatts i varje provbrunn.
3. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
4. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
5. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
6. Placera MIDI-plattan LP2 på det magnetiska stativet i 10 minuter.
7. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje provbrunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

1. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
 - a. Låt MIDI-plattan LP2 vara kvar på det magnetiska stativet och tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH i varje provbrunn.
 - b. Vänta i 30 sekunder.
 - c. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje provbrunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta magnetkulorna en **andra** gång.
3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EtOH från varje brunn.
4. Kassera den 80-procentiga EtOH som inte har använts.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan LP2 från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 27,5 µl RSB i varje provbrunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
6. Inkubera i rumstemperatur i två minuter.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

7. Placera MIDI-plattan LP2 på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med LS (biblioteksprov).
9. Överför 25 µl av varje eluat från MIDI-plattan LP2 till motsvarande brunnar på PCR-plattan LS.
10. Kassera den tomma MIDI-plattan LP2.

Index PCR

I det här steget amplifieras biblioteksfragment med hjälp av primrar som tillför indexsekvenser för provmultiplexering. Den resulterande produkten innehåller det fullständiga biblioteket med cDNA och/eller DNA-fragment omgivna av adaptrar som krävs för klustergenerering.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - EPM – Förvara kallt.
 - UPxx – vortexblanda och centrifugera kort. UPxx är den indexprimer som är vald på skärmen Create Run (Skapa körning) i Local Run Manager (lokal körningshanterare)-programvaran under körningskonfigurationen.
 - CPxx – vortexblanda och centrifugera kort. CPxx är den indexprimer som är vald på skärmen Create Run (Skapa körning) i Local Run Manager (lokal körningshanterare)-programvaran under körningskonfigurationen.
2. Kontrollera att indexen för varje prov överensstämmer med körningen som planerades i Analysmodulen TSO Comprehensive (EU) under körningskonfigurationen. Följ anvisningarna om att välja index i avsnittet [Antalet bibliotek och att välja index på sidan 36](#).



FÖRSIKTIGHET

Bristande överensstämmelse mellan proven och indexprimrarna orsakar felaktig resultatrapportering på grund av förlust av positiv providentifikation.

Förfarande

1. Tillsätt 5 µl av lämplig indexprimer (UPxx eller CPxx) i motsvarande provbrunn på PCR-plattan LS i enlighet med de index som valdes.



FÖRSIKTIGHET

Hantera och öppna endast ett indexprimerrör åt gången. Sätt omedelbart tillbaka ett nytt lock på varje indexrör efter användning. Kombinera inte indexprimrar med varandra.

2. Vortexblanda EPM i fem sekunder och centrifugera därefter kort.
3. Tillsätt 20 µl EPM i varje provbrunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan LS.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.

5. Skaka vid 1 200 rpm i en minut.
6. Ställ tillbaka pre-amplifieringsreagenserna på förvaringsplatsen.



FÖRSIKTIGHET

Utför alla efterföljande steg i ett post-amplifieringsområde för att förhindra överföring av amplifieringsprodukt.

7. Centrifugera PCR-plattan LS vid $280 \times g$ i en minut.
8. Placera den förprogrammerade termocyklern för post-amplifiering och kör I-PCR-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
Om du fortsätter med [Starta den första hybridiseringen på sidan 58](#) ska du följa tiningsanvisningarna för reagenser i avsnittet Beredning för protokollsteg.
9. Centrifugera PCR-plattan LS vid $280 \times g$ i en minut efter att I-PCR-programmet har slutförts.
10. Märk om plattan med ALS (amplifierade biblioteksprover).

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du förvara PCR-plattan ALS vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till 30 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till hybridiseringen över natt.

1. Kontrollera att termocyklerprogrammen för post-amplifiering är konfigurerade. Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
2. Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
TCB1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Tabell 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
TCA1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Tabell 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (artikelnr 20031122)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
OPR1 (rött lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen
OPD2 (vitt lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Starta den första hybridiseringen

Under den här processen hybridiseras en oligouppsättning till cDNA-bibliotek, och en oligouppsättning hybridiseras till gDNA-bibliotek som beredd under steget [Index PCR på sidan 56](#). Anrikning av målregioner kräver två hybridiseringssteg. Vid den första hybridiseringen hybridiserades oligouppsättningen till cDNA- och/eller gDNA-bibliotek över natten (8–24 timmar).

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - TCB1 – värm röret vid 37 °C i fem minuter. Vortexblanda i 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - TCA1 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPR1 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPD2 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
2. Om PCR-plattan ALS har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och centrifugera vid 280 × g i en minut. Blanda genom att pipettera.
3. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med HYB1 (hybridisering 1).

Förfarande

1. Överför 20 µl av varje cDNA- och/eller gDNA-bibliotek från PCR-plattan ALS till motsvarande brunnar på PCR-plattan HYB1.
2. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ALS och ställ undan.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
3. Kontrollera om det förekommer precipitat i TCB1. Om precipitat förekommer ska du värma röret igen och vortexblanda röret tills kristallerna har löst upp sig.
4. Tillsätt 15 µl TCB1 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan HYB1.
5. Tillsätt 10 µl TCA1 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan HYB1.
6. Tillsätt prober.
Kombinera *inte* olika typer av prober. Lägg endast till en probuppsättning per brunn.
 - **[RNA-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPR1 (rött lock) i varje bibliotek som härrör från RNA.
 - **[DNA-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPD2 (vitt lock) i varje bibliotek som härrör från DNA.
7. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan HYB1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
8. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
9. Placera på termocyklern och kör HYB1-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
10. Hybridisera vid 57 °C i minst åtta timmar och högst 24 timmar.
11. Ställ tillbaka hybridiseringsreagenserna på förvaringsplatsen.
12. Förvara PCR-plattan ALS vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna i början av dag två.

Tabell 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
SMB (mörkblå märkning)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Fånga mål 1 Fånga mål 2
ET2	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fånga mål 1 Fånga mål 2
HP3	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fånga mål 1 Fånga mål 2 Normalisera bibliotek

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
TCB1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen
RSB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fånga mål 2 Rena amplifierade anrikade bibliotek

Tabell 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
EE2	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Fånga mål 1 Fånga mål 2 Normalisera bibliotek
EEW	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Fånga mål 1
TCA1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen

Tabell 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (artikelnr 20031122)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
OPR1 (rött lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen
OPD2 (vitt lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen

Fånga mål 1

I det här steget används SMB för att fånga prober som är hybridiserade till målintresseområdet. Magnetkulorna tvättas med EEW tre gånger. De anrikade biblioteken elueras med ny EE2+HP3-elueringsblandning och neutraliseras med ET2.

Beredning

1. Förvärm en mikroprovsinkubator med en MIDI-insats för värmeblock till 57 °C.
2. Bered följande reagenser.
 - EEW – vortexblanda i en minut.
 - EE2 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - HP3 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - SMB – kontrollera att magnetkulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
Använd **SMB**, inte SPB, för det här förfarandet.
 - ET2 – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
3. Bered ny EE2+HP3-elueringsblandning i ett mikrocentrifugrör.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 29 EE2 + HP3-elueringsblandning för steget Fånga mål 1*

Komponent i elueringsblandning	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Beräkningar finns i avsnittet [Hantering av reagenser på sidan 34](#).

4. Vortexblanda EE2+HP3-elueringsblandningen och centrifugera sedan kort. Lägg åt sidan för [Eluera på sidan 62](#).
5. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med CAP1 (Fånga 1).
6. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Avlägsna PCR-plattan HYB1 från termocyklern.
2. Centrifugera PCR-plattan HYB1 vid 280 × g i en minut.
3. Vortexblanda SMB i en minut för att återsuspendera magnetkulorna.
Om utfällning eller pelleten förekommer, se till att uppnå rumstemperatur, pipettera uppåt och nedåt för att frigöra pelleten och vortexa sedan för att suspendera igen.
4. Tillsätt omedelbart 150 µl SMB i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP1.
Om du använder ett tråg för att dispensera SMB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,15 vid alikvotering, för att möjliggöra tillräckligt med material per prov.
5. Kassera eventuellt kvarvarande material när SMB har tillsatts i varje provbrunn.
6. Ställ in pipetten på 50 µl och överför hela volymen av varje bibliotek från PCR-plattan HYB1 till motsvarande brunnar på MIDI-plattan CAP1.
7. Kassera den tomma PCR-plattan HYB1.
8. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
9. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
10. Inkubera i den förvärmade mikroprovsinkubatorn vid 57 °C i 25 minuter.
11. Placera MIDI-plattan CAP1 på ett magnetiskt stativ i två minuter.
12. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.



FÖRSIKTIGHET

Fortsätt omedelbart till nästa steg ([Tvätta på sidan 62](#)). Låt inte pelleten ligga framme utan vätska under en längre tid.

Tvätta

1. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
 - a. Avlägsna MIDI-plattan CAP1 från det magnetiska stativet.
 - b. Tillsätt 200 µl EEW i varje brunn.
 - c. Använd en pipett inställd på 150 µl och pipettera minst tio gånger för att blanda. Kontrollera att alla magnetkolor återsuspenderas.
Kontrollera att inga pellets förekommer genom att försiktigt aspirera alla brunnars lösning med magnetkolor in i spetsen. Kontrollera botten av varje brunn visuellt. Om det finns en kulpellet ska du vinkla pipettspetsen mot pelleten under tvättningsstegen för att flytta på pelleten. Kontrollera att pelleten är helt nedsänkt i lösning. Lösningen ska vara mörkbrun och ha en homogen konsistens.
 - d. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP1.
 - e. Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
 - f. Skaka vid 1 800 rpm i fyra minuter.
 - g. Inkubera i en mikroprovsinkubator vid 57 °C i fem minuter.
 - h. Placera MIDI-plattan CAP1 på ett magnetiskt stativ i två minuter.
 - i. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta magnetkulorna en **andra** gång.
3. Tvätta magnetkulorna en **tredje** gång.
4. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EEW från varje brunn.

Eluera

1. Avlägsna MIDI-plattan CAP1 från det magnetiska stativet.
2. Vortexblanda ny EE2+HP3-elueringsblandning och centrifugera sedan kort.
3. Tillsätt försiktigt 17 µl EE2+HP3-elueringsblandning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP1.
4. Kassera resterande EE2+HP3-elueringsblandning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP1.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med ELU1 (eluering 1).
9. Vortexblanda ET2 och centrifugera sedan kort.
10. Tillsätt 5 µl ET2 i varje motsvarande biblioteksbrunn på den nya PCR-plattan ELU1.
11. Överför försiktigt 15 µl eluat från varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP1 till motsvarande brunnar på PCR-plattan ELU1.
12. Kassera den tomma MIDI-plattan CAP1.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

13. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
14. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
15. Ställ tillbaka EEW på förvaringsplatsen.

Starta den andra hybridiseringen

I det här steget binds målregioner i anrikade cDNA- och/eller gDNA-bibliotek med fångade prober en andra gång. Den andra hybridiseringen säkerställer hög specificitet för de fångade regionerna. Säkerställ optimal biblioteksanrikning genom att utföra det andra hybridiseringssteget vid 57 °C i minst en och en halv timme och högst fyra timmar.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - TCB1 – värm röret vid 37 °C i fem minuter. Vortexblanda i 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - TCA1 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPR1 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPD2 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.

Förfarande

1. Kontrollera om det förekommer precipitat i TCB1. Om precipitat förekommer ska du värma röret igen och vortexblanda tills kristallerna har löst upp sig.
2. Tillsätt 15 µl TCB1 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan ELU1.
3. Tillsätt 10 µl TCA1 i varje biblioteksbrunn.
4. Tillsätt samma sond som användes under den första hybridiseringen till varje brunn. Lägg endast till en probuppsättning per brunn.
Kombinera *inte* olika typer av prober.
 - **[RNA-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPR1 (rött lock) i varje bibliotek som härrör från RNA.
 - **[DNA-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPD2 (vitt lock) i varje bibliotek som härrör från DNA.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
6. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
7. Placera på en termocykler och kör HYB2-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
8. Hybridisera vid 57 °C i minst en och en halv timme och högst fyra timmar.
9. Ställ tillbaka hybridiseringsreagenserna på förvaringsplatsen.

Fånga mål 2

I det här steget används SMB för att fånga prober som är hybridiserade till målintresseområdet. Magnetkulorna tvättas med RSB en gång. De anrikade biblioteken elueras med ny EE2+HP3-elueringsblandning och neutraliseras med ET2.

Beredning

1. Förvärm en mikroprovsinkubator med MIDI-insats för värmeblock till 57 °C.
2. Bered följande reagenser.
 - EE2 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - HP3 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - SMB – kontrollera att magnetkulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter. Använd **SMB**, inte SPB, för det här förfarandet.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
 - ET2 – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
3. Bered ny EE2+HP3-elueringsblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 30 EE2 + HP3 elueringsblandning för steget Fånga mål två*

Komponent i elueringsblandning	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Beräkningar finns i avsnittet [Hantering av reagenser på sidan 34](#).

4. Vortexblanda och centrifugera sedan kort. Lägg åt sidan för steget [Eluera på sidan 65](#).
5. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med CAP2 (fånga 2).
6. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Avlägsna PCR-plattan ELU1 från termocyklern.
2. Centrifugera PCR-plattan ELU1 vid 280 × g i en minut.
3. Vortexblanda SMB i en minut för att återsuspendera magnetkulorna.
Om utfällning eller pelleten förekommer, se till att uppnå rumstemperatur, pipettera uppåt och nedåt för att frigöra pelleten och vortexa sedan för att suspendera igen.
4. Tillsätt omedelbart 150 µl SMB i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP2.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Om du använder ett tråg för att dispensera SMB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,15 vid alikvotering, för att möjliggöra tillräckligt med material per prov.

5. Kassera eventuellt kvarvarande material när SMB har tillsatts i varje provbrunn.
6. Ställ in pipetten på 50 µl och överför hela volymen av varje bibliotek från PCR-plattan ELU1 till motsvarande brunnar på MIDI-plattan CAP2.
7. Kassera den tomma PCR-plattan ELU1.
8. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
9. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
10. Inkubera i en mikroprovsinkubator vid 57 °C i 25 minuter.
Om du fortsätter med [Amplifiera anrikat bibliotek på sidan 67](#), ska du följa instruktionerna för reagenser i avsnittet [Förbered för protokoll](#).
11. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
12. Håll MIDI-plattan CAP2 på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.



FÖRSIKTIGHET

Fortsätt omedelbart till nästa steg ([Tvätta på sidan 65](#)). Låt inte pelleten ligga framme utan vätska under en längre tid.

Tvätta

1. Avlägsna MIDI-plattan CAP2 från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 200 µl RSB i varje brunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i fyra minuter.
6. Ställ plattan på det magnetiska stativet i två minuter.
7. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
8. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande RSB från varje brunn.

Eluera

1. Avlägsna MIDI-plattan CAP2 från det magnetiska stativet.
2. Vortexblanda ny EE2+HP3-elueringsblandning och centrifugera sedan kort.
3. Tillsätt 22 µl EE2+HP3-elueringsblandning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP2.
4. Kassera resterande EE2+HP3-elueringsblandning.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med ELU2 (eluering 2).
9. Vortexblanda ET2 och centrifugera sedan kort.
10. Tillsätt 5 µl ET2 i varje motsvarande biblioteksbrunn på den nya PCR-plattan ELU2.
11. Överför försiktigt 20 µl eluat från varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP2 till motsvarande brunnar på PCR-plattan ELU2.
12. Kassera den tomma MIDI-plattan CAP2.
13. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
14. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
15. Ställ tillbaka SMB, EE2, HP3, RSB och ET2 på förvaringsplatsen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan ELU2 vid $280 \times g$ i en minut och förvara den vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

1. Förbered en ishink eller motsvarande.
2. Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
PPC3	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Amplifiera anrikat bibliotek
EPM	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara kallt.	Amplifiera anrikat bibliotek

Tabell 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
SPB (ljusgrön märkning)	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Rena amplifierade anrikade bibliotek
RSB	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara i rumstemperatur.	Rena amplifierade anrikade bibliotek Beredning för sekvensering

Amplifiera anrikat bibliotek

I det här steget används primrar för att amplifiera anrikade bibliotek.

Beredning

1. Om ELU2-plattan har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och därefter centrifugera vid $280 \times g$ i en minut.

Förfarande

1. Vortexblanda PPC3 och centrifugera därefter kort.
2. Tillsätt 5 µl PPC3 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan ELU2.
3. Vortexblanda EPM i fem sekunder och centrifugera därefter kort.
4. Tillsätt 20 µl EPM i varje biblioteksbrunn.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
6. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
7. Placera på en termocykler och kör EL-PCR-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 42](#).
Om du fortsätter med [Normalisera bibliotek på sidan 70](#), ska du följa tiningsanvisningarna i avsnittet [Förbered för protokoll](#).
8. Ställ tillbaka PPC3 och EPM på förvaringsplatsen.

Rena amplifierade anrikade bibliotek

I det här steget används SPB för att rena de anrikade biblioteken från oönskade reaktionskomponenter. Magnetkulorna tvättas två gånger med ny 80-procentig etanol. Biblioteken elueras med RSB.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - SPB – kontrollera att magnetkulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter. Använd **SPB** och inte SMB för det här förfarandet.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
2. Bered ny 80-procentig etanol i ett koniskt rör på 15 ml eller 50 ml.

Tabell 33 Förbered färsk 80-procentig etanol

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

3. Vortexblanda ny 80-procentig EtOH.
4. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med BIND2 (reningsbindning).
5. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Avlägsna PCR-plattan ELU2 från termocyklern.
2. Centrifugera PCR-plattan ELU2 vid 280 × g i en minut.
3. Vortexblanda SPB i en minut för att återsuspendera magnetkulorna.
4. Tillsätt omedelbart 110 µl SPB i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BIND2.
5. Överför 50 µl av varje bibliotek från PCR-plattan ELU2 till motsvarande brunnar på MIDI-plattan BIND2.
6. Kassera den tomma PCR-plattan ELU2.
7. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BIND2.
Försegla kanter och brunnar helt.
8. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
9. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
10. Placera MIDI-plattan BIND2 på ett magnetiskt stativ i fem minuter.
11. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

1. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
 - a. Låt BIND2 MIDI-plattan vara kvar på det magnetiska stativet och tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH i varje brunn.
 - b. Vänta i 30 sekunder.
 - c. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta magnetkulorna en **andra** gång.
3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EtOH från varje brunn.
4. Kassera den 80-procentiga EtOH som inte har använts.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan BIND2 från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 32 µl RSB i varje biblioteksbrunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BIND2.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
6. Inkubera i rumstemperatur i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med PL (renade bibliotek).
9. Överför 30 µl av varje eluat från MIDI-plattan BIND2 till motsvarande brunnar på PCR-plattan PL.
10. Kassera den tomma MIDI-plattan BIND2.
11. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan PL.
12. Ställ tillbaka SPB och RSB på förvaringsplatsen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan PL vid 280 × g i en minut och förvara den vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

1. Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
LNA1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Normalisera bibliotek
EE2	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Normalisera bibliotek

Tabell 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
LNB1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Normalisera bibliotek
HP3	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Normalisera bibliotek Beredning för sekvensering
LNW1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Normalisera bibliotek
LNS1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Normalisera bibliotek

2. Om du fortsätter med [Beredning för sekvensering på sidan 73](#) samma dag, ska du följa tiningsanvisningarna i avsnittet [Förbered för protokoll](#).

Normalisera bibliotek

I den här processen används LNB1 och tillsatser (LNA1) för att normalisera antalet i varje bibliotek för att säkerställa en enhetlig biblioteksrepresentation i uppsättningsbiblioteken. Magnetkulorna tvättas med LNW1 två gånger. Biblioteken elueras med ny EE2+HP3-elueringsblandning och neutraliseras med LNS1.

Beredning

- Bered följande reagenser.
 - LNB1 – kontrollera att magnetkulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
 - LNA1 – vortexblanda.
 - EE2 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - HP3 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - LNW1 – vortexblanda. Ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
 - LNS1 – vortexblanda. Ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
- Vortexblanda LNB1 i en minut för att återsuspendera magnetkulorna.
Vänd LNB1-röret för att kontrollera att alla magnetkulor är återsuspenderade.
- Använd en pipett inställd på 800 µl och pipettera LNB1 upp och ner tio gånger för att säkerställa återsuspension.
- Bered omedelbart ny LNA1+LNB1-masterblandning i ett koniskt rör.



FÖRSIKTIGHET

Återsuspendera LNB1-pelleten helt längst ner i röret för att förhindra inkonsekvent klusterdensitet.

Tabell 36 LNA1+LNB1-masterblandning*

Masterblandningskomponent	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
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

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Beräkningar finns i avsnittet [Hantering av reagenser på sidan 34](#).

- Vortexblanda LNA1+LNB1-masterblandningen. Lägg åt sidan för steget [Bind på sidan 71](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

6. Bered ny EE2+HP3-elueringsblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 37 EE2+HP3-elueringsblandning för normaliserade bibliotek*

Komponent i elueringsblandning	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Beräkningar finns i avsnittet [Hantering av reagenser på sidan 34](#).

7. Vortexblanda ny elueringsblandning och centrifugera sedan kort. Lägg åt sidan för steget [Eluera på sidan 72](#).
8. Om PCR-plattan PL har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och centrifugera vid 280 × g i en minut. Blanda genom att pipettera.
9. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med BBN (magnetkulebaserad normalisering).
10. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bind

1. Vortexblanda LNA1+LNB1-masterblandningen.
2. Tillsätt omedelbart 45 µl LNA1+LNB1-masterblandning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BBN.
3. Kassera resterande LNA1+LNB1-masterblandning.
4. Tillsätt 20 µl av varje bibliotek från PCR-plattan PL till motsvarande brunnar på MIDI-plattan BBN.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BBN.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i 30 minuter.
7. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan PL och förvara igen.
8. Placera MIDI-plattan BBN på ett magnetiskt stativ i två minuter.
9. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

1. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
 - a. Avlägsna MIDI-plattan BBN från det magnetiska stativet.
 - b. Tillsätt 45 µl LNW1 i varje biblioteksbrunn.
 - c. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BBN.
Försegla kanter och brunnar helt.
 - d. Skaka vid 1 800 rpm i fem minuter.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- e. Placera MIDI-plattan BBN på ett magnetiskt stativ i två minuter.
 - f. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta magnetkulorna en *andra* gång.
 3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande supernatant från varje brunn.

Eluera

1. Avlägsna MIDI-plattan BBN från det magnetiska stativet.
2. Vortexblanda ny EE2+HP3-elueringsblandning och centrifugera sedan kort.
3. Tillsätt 32 µl EE2+HP3-lösning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BBN.
4. Kassera resterande elueringsblandning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BBN.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med NL (normaliserade bibliotek).
9. Överför försiktigt 30 µl eluat från varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BBN till motsvarande brunnar på PCR-plattan NL.



FÖRSIKTIGHET

Om magnetkulorna aspireras in i pipettspetsarna ska du dispensera tillbaka magnetkulorna till plattan på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är transparent (cirka två minuter) innan du fortsätter till nästa steg av förfarandet.

10. Kassera den tomma MIDI-plattan BBN.
11. Vortexblanda LNS1.
12. Tillsätt 30 µl LNS1 i varje biblioteksbrunn på den nya PCR-plattan NL.
13. Blanda genom att pipettera fem gånger.
14. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan NL.
Försegla kanter och brunnar helt.
15. Ställ tillbaka LNB1, LNA1, EE2, LNW1 och LNS1 på förvaringsplatsen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan NL vid $280 \times g$ i en minut och förvara den vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till 32 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till sekvensering.

Inled beredningen av förbrukningsmaterial för sekvensering från NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (artikelnummer 20028871) minst en timme innan användning.

1. Avlägsna biblioteksspänningsbufferten (HT1) från förvaringen vid -25 °C till -15 °C. Tina till rumstemperatur. Förvaras kallt efter upptining.
2. Följ beredningsanvisningarna i *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)* för andra förbrukningsmaterial i satsen.
 - 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. Avlägsna reagensrören från förpackningen och följ tiningsanvisningarna.

Tabell 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
PhiX Internal Control (PX3 eller PhiX)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur. Förvaras kallt efter upptining.	Beredning för sekvensering

Tabell 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123)

Reagens	Förvaring	Tiningsanvisningar	Protokollsteg
HP3	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Beredning för sekvensering
RSB (rosa märkning)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Beredning för sekvensering

Beredning för sekvensering

Varje DNA- och RNA-sekvenseringskörning ska inkludera en positiv kontroll och en kontroll utan mall. Kontrollerna utan mallar för DNA och RNA sekvenseras så många gånger som det behövs för att varje körning ska innehålla en kontroll utan mall. Varje DNA- och RNA-körning inkluderar en separat positiv kontroll.

Beredning

1. Läs riktlinjerna i avsnittet [Antalet bibliotek och att välja index på sidan 36](#).
2. Märk ett mikrocentrifugrör med dHP3 (utspädd HP3).
3. Märk ett mikrocentrifugrör med dPhiX (utspädd PhiX).
4. Förvärm ett värmeblock till 96 °C för mikrocentrifugrör.

5. Förbered en ishink eller motsvarande.

Späd och denaturera PhiX Control

1. Vortexblanda HP3 och centrifugera sedan kort.
2. Överför följande volymer till dHP3-mikrocentrifugröret.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNas-/DNas-fritt vatten
3. Vortexblanda dHP3 och centrifugera sedan kort.
4. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
5. Vortexblanda PhiX Control och centrifugera sedan kort.
6. Överför följande volymer till PhiX-mikrocentrifugröret.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX Control
7. Tillsätt 10 µl dHP3 i dPhiX-röret.
8. Kassera dHP3-röret.
9. Vortexblanda dPhiX-röret och centrifugera sedan kort.
10. Inkubera dPhiX i rumstemperatur i fem minuter för att denaturera.
11. Vortexblanda HT1.
12. Tillsätt omedelbart 980 µl förkyld HT1 till dPhiX.
13. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
14. Förvara PhiX kall tills den ska användas i beredningen för den andra spädningen.
Den slutliga koncentrationen är 20 pM dPhiX.
15. Ställ tillbaka PhiX, HP3 och RSB på förvaringsplatsen.

Samla och denaturera bibliotek för TSO Comprehensive (EU)

1. Om PCR-plattan NL har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och därefter centrifugera plattan vid 280 × g i en minut.
2. Använd en pipett med flera kanaler inställd på 30 µl och pipettera försiktigt biblioteken på PCR-plattan NL fem gånger för att blanda.
Använd nya spetsar för varje bibliotek.



FÖRSIKTIGHET

Var noga med att blanda biblioteken väl för optimala prestanda.

3. Välj ett av följande alternativ för att samla, denaturera och späda ut biblioteken.
 - **[Alternativ 1]** Sekvensera bibliotek från RNA-prover och DNA-prover samtidigt. Se [Alternativ 1: DNA- och RNA-bibliotek tillsammans på sidan 75](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

- **[Alternativ 2]** Sekvensera endast bibliotek från DNA-prover. Se [Alternativ 2: Endast DNA-bibliotek på sidan 76](#).
- **[Alternativ 3]** Sekvensera endast bibliotek från RNA-prover. Se [Alternativ 3: Endast RNA-bibliotek på sidan 77](#).

Alternativ 1: DNA- och RNA-bibliotek tillsammans

1. Märk ett mikrocentrifugrör med PRL (RNA-biblioteksuppsättning).
2. Märk ett mikrocentrifugrör med PDL (DNA-biblioteksuppsättning).
3. Överför 10 µl av varje normaliserat RNA-bibliotek (cDNA) från NL-plattan till PRL-röret.
Samla inte två bibliotek med samma indexprimer i samma uppsättning.
4. Överför 10 µl av varje normaliserat DNA-bibliotek från NL-plattan till PDL-röret.
Samla inte två bibliotek med samma indexprimer i samma uppsättning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan NL.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Vortexblanda PRL- och PDL-rören.
7. Centrifugera PRL- och PDL-rören kortvarigt.
8. Inkubera PRL- och PDL-rören på ett värmeblock vid 96 °C i två minuter.
9. Förvara PRL- och PDL-rören kallt i fem minuter.
10. Vortexblanda PRL- och PDL-rören för att blanda, och centrifugera sedan kortvarigt.
11. Förvara PRL- och PDL-rören kallt.

Beredning av första spädningen

1. Märk ett mikrocentrifugrör med DIL1 (spädning 1).
2. Överför 20 µl PDL till det tomma DIL1-röret.
3. Tillsätt 5 µl PRL till DIL1-röret.
4. Kassera PDL- och PRL-rören.
5. Tillsätt 475 µl förkyld HT1 till DIL1-röret (1:20 spädning).
6. Vortexblanda DIL1-röret och centrifugera sedan kort.

Beredning av den andra spädningen

1. Märk ett 2,0 ml mikrocentrifugrör med DIL2 (spädning 2).
2. Överför 40 µl DIL1 till det tomma DIL2-röret.
3. Kassera DIL1-röret.
4. Tillsätt 1 660 µl förkyld HT1 till DIL2-röret (1:850 spädning).
5. Vortexblanda beredd 20 pM dPhiX och centrifugera sedan kort.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

6. Tillsätt 2,5 µl beredd 20 pM dPhiX till DIL2-röret.
7. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
8. För över 1 300 µl DIL2 till tinade NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.
9. Kassera DIL2-röret.
10. Centrifugera PCR-plattan NL vid 280 × g i en minut och förvara därefter vid -25 °C till -15 °C i upp till 32 dagar.
11. Fortsätt till sekvensering.
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Alternativ 2: Endast DNA-bibliotek

1. Märk ett mikrocentrifugrör med PDL (DNA-biblioteksuppsättning).
2. Överför 10 µl av varje normaliserat DNA-bibliotek från NL-plattan till PDL-röret.
Samla inte två bibliotek med samma indexprimer i samma uppsättning.
3. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan NL.
Försegla kanter och brunnar helt.
4. Vortexblanda PDL-röret för att blanda och centrifugera sedan kortvarigt.
5. Inkubera PDL-röret på ett värmeblock vid 96 °C i två minuter.
6. Förvara PDL-röret kallt i fem minuter.
7. Vortexblanda PDL-röret för att blanda och centrifugera sedan kortvarigt.
8. Förvara PDL-röret kallt.

Beredning av första spädningen

1. Märk ett mikrocentrifugrör med DIL1 (spädning 1).
2. Överför 10 µl PDL till det tomma DIL1-röret.
3. Kassera PDL-röret.
4. Tillsätt 190 µl förkyld HT1 till DIL1-röret (1:20 spädning).
5. Vortexblanda DIL1 för att blanda, och centrifugera sedan kortvarigt.

Beredning av den andra spädningen

1. Märk ett 2,0 ml mikrocentrifugrör med DIL2 (spädning 2).
2. Överför 40 µl DIL1 till det tomma DIL2-röret.
3. Kassera DIL1-röret.
4. Tillsätt 1 660 µl förkyld HT1 till DIL2-röret (1:850 spädning).
5. Vortexblanda beredd 20 pM dPhiX och centrifugera sedan kort.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

6. Tillsätt 2,5 µl beredd 20 pM dPhiX till DIL2-röret.
7. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
8. För över 1 300 µl DIL2 till tinade NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.
9. Kassera DIL2-röret.
10. Centrifugera PCR-plattan NL vid 280 × g i en minut och förvara därefter vid -25 °C till -15 °C i upp till 32 dagar.
11. Fortsätt till sekvensering.
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Alternativ 3: Endast RNA-bibliotek

1. Märk ett mikrocentrifugrör med PRL (RNA-biblioteksuppsättning).
2. Överför 10 µl av varje normaliserat RNA-bibliotek (cDNA) från NL-plattan till PRL-röret.
Samla inte två bibliotek med samma indexprimer i samma uppsättning.
3. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan NL.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
4. Vortexblanda PRL-röret för att blanda.
5. Centrifugera PRL-röret kortvarigt.
6. Inkubera PRL-röret på ett värmeblock vid 96 °C i två minuter.
7. Förvara PRL-röret kallt i fem minuter.
8. Vortexblanda PRL-röret för att blanda och centrifugera sedan kortvarigt.
9. Förvara PRL-röret kallt.

Beredning av första spädningen

1. Märk ett mikrocentrifugrör med DIL1 (spädning 1).
2. Överför 10 µl PRL till det tomma DIL1-röret.
3. Kassera PRL-röret.
4. Tillsätt 190 µl förkyld HT1 till DIL1-röret (1:20 spädning).
5. Vortexblanda DIL1 för att blanda, och centrifugera sedan kortvarigt.

Beredning av den andra spädningen

1. Märk ett 2,0 ml mikrocentrifugrör med DIL2 (spädning 2).
2. Överför 40 µl DIL1 till det tomma DIL2-röret.
3. Kassera DIL1-röret.
4. Tillsätt 1 646 µl förkyld HT1 till DIL2-röret (1:843 spädning).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

5. Vortexblanda beredd 20 pM dPhiX och centrifugera sedan kort.
6. Tillsätt 16,7 µl beredd 20 pM dPhiX till DIL2-röret.
7. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
8. För över 1 300 µl DIL2 till tinade NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.
9. Kassera DIL2-röret.
10. Centrifugera PCR-plattan NL vid 280 × g i en minut och förvara vid -25 °C till -15 °C i upp till 32 dagar.
11. Fortsätt till sekvensering.
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Tolkning av resultat

Sekvenseringsresultaten från TSO Comprehensive (EU)-analysen rapporteras för varje individuellt prov i en PDF-rapport och en JSON-rapport. En rapport om lågt djup (`LowDepthReport.tsv`) genereras även på provnivå.

På körningsnivån genereras följande utdatafiler:

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

Endast varianter som blir godkända i kvalitetskontrollen visas i PDF- och JSON-rapporterna.

Detaljerad analysinformation finns i *Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661)*.

Resultat från produkter för behandlingsvägledande diagnostik

Det finns tre möjliga resultat för den avsedda användningen för varje produkt för behandlingsvägledande diagnostik (CDx):

- **Positiv** – En variant eller biomarkör identifieras och klassificeras som nivå 1 (CDx).
- **Identifierades inte** – Inga varianter eller biomarkörer som är associerade med den CDx-avsedda användningen identifierades i provet. Tumörtypen som är vald för provet är lämplig för CDx.
- **Inget resultat** – Det går inte att fastställa en variantstatus av en eller flera av följande anledningar:
 - Den CDx-avsedda användningen är inte tillämplig för det testade provet eftersom den tumörtyp som har valts för provet inte är lämplig för CDx-tumörtypen.
 - Sekvenseringskörningen blev inte godkänd i kvalitetskontrollen.
 - Biblioteket blev inte godkänt i kvalitetskontrollen.
 - Lämplig nukleinsyra kördes inte.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Alla resultat från den CDx-avsedda användningen rapporteras i avsnittet Resultat från produkt för behandlingsvägledande diagnostik i JSON-rapporten. Endast avsedda användningar med ett positivt resultat listas i avsnittet Resultat från produkt för behandlingsvägledande diagnostik i PDF-rapporten.

Tumörprofileringsvarianter

TSO Comprehensive (EU) är utformad för att rapportera somatiska varianter vid rapportering av varianter med evidens för klinisk signifikans eller varianter med potentiell klinisk signifikans. TSO Comprehensive (EU)-analysprogrammet använder en kunskapsbas som fastställer om varje detekterad och kvalificerad variant ([Tabell 2](#)) är kliniskt signifikant eller potentiellt kliniskt signifikant, baserat på evidens för terapeutiska, diagnostiska eller prognostiska associationer. Kunskapsbasen tar även hänsyn till om associationer är fastställda (eller inte) i den testade tumörtypen. Känslighets- eller cancerrisksassociationer inkluderas inte i kunskapsbasen. Gemensamma polymorfismer tas bort.

För tumörprofileringsvarianter klassificeras positiva resultat som Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (Level 2) (Genomiska resultat med evidens för klinisk signifikans) (nivå 2) eller Genomic Findings with Potential Clinical Significance (Level 3) (Genomiska resultat med potentiell klinisk signifikans) (nivå 3) enligt den installerade kunskapsbasen och den identifierade tumörtypen.

Kvalitetskontrollfel leder till att inga resultat rapporteras för de varianttyper som är relevanta för måttet för den misslyckade kvalitetskontrollen. Se [Tabell 40](#) och [Tabell 41](#) för ytterligare information.

Tumörprofileringspositioner med otillräckligt djup listas i Low Depth Report (Rapport om lågt djup) och inte i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Kvalitetskontroll

- Mer information om nukleinsyrekvantifiering och minimikrav på material finns i avsnittet [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28](#).
- Sekvenseringskörning och provvaliditet fastställs automatiskt och rapporteras av Analysmodulen TSO Comprehensive (EU). Detaljerad analysinformation finns i *Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661)*.
- TSO Comprehensive (EU)-rapporten, som är tillgänglig i PDF- och JSON-format, sammanfattar kvalitetskontrollresultaten. Rapportfilerna finns i analysmappen. Se *Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661)* för platsen för analysmappen (innehåller PDF- och JSON-rapporter) samt körningsmappen.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 40 Kvalitetskontrollmått för TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning	Påverkan av specifikationsfel*
Sekvenseringskörning	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Procentandel avläsningar som passerar filtret (PF).	Sekvenseringskörningen ogiltigförklarad. Inga resultat rapporteras för något prov i körningen.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Genomsnittlig procentandel basbestämningar med ett kvalitetsresultat på minst Q30 för Read 1 (Avläsning 1).	Sekvenseringskörningen ogiltigförklarad. Inga resultat rapporteras för något prov i körningen.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Genomsnittlig procentandel basbestämningar med ett kvalitetsresultat på minst Q30 för Read 2 (Avläsning 2).	
DNA-bibliotek	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3 106 ELLER > 3 106 och P_VALUE ≤ 0,049	Ett mått för att utvärdera sannolikheten för kontaminering genom att använda VAF för vanliga varianter. Kontamineringsresultatet baseras på VAF-fördelningen av SNP:er. P-värdet för kontamination används för att bedöma starkt omorganiserade genom. Det är endast tillämpligt när kontaminationspoängen ligger över den övre specifikationsgränsen.	Inga DNA-resultat rapporteras.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning	Påverkan av specifikationsfel*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Medianvärdet för fragmentlängd i provet.	Inga resultat för TMB eller små DNA-varianter rapporteras.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (antal)	≥ 150	Täckning av medianexonfragment för alla exonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procentandel exonbaser med 50x fragmenttäckning.	
	USABLE_MSI_SITES (antal)	≥ 40	Antalet MSI-platser som är användbara för MSI-bestämning (antal mikrosatellitplatser med tillräckligt omfattande avläsningar för att identifiera mikrosatellitinstabilitet).	Inga MSI-resultat rapporteras.
	COVERAGE_MAD (antal)	$\leq 0,210$	Medianen av absoluta avvikelser från medianen av normaliserade värden för varje CNV-målregion.	Inga genamplifieringsresultat rapporteras.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (antal)	$\geq 1,0$	Medianvärdet för diskreta värden per CNV-mål.	
RNA-bibliotek	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Medianvärdet för fragmentlängd i provet.	Inga fusions- eller splicevariantresultat rapporteras.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning	Påverkan av specifikationsfel*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koefficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X är ett mått på täckningens enhetlighet. För varje gen med minst 500x täckning beräknas variationskoefficienten för täckning av hela genen. Det här måttet är medianen av de värdena. Ett högt värde indikerar en hög nivå variation och problem i biblioteksprepareringen, till exempel lågt antal prover och/eller probfel. Det här måttet beräknas med hjälp av alla avläsningar (inklusive avläsningar som är märkta som dubletter).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (antal)	$\geq 9\,000\,000$	Det totala antalet avläsningar som mappas till målregionerna. Det här måttet beräknas med hjälp av alla avläsningar (inklusive avläsningar som är märkta som dubletter).	

* Lyckade resultat visas som PASS (GODKÄND).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 41 Kontrollmått för TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Påverkan av specifikationsfel*
Positive Control (Positiv kontroll)	DNA External Control (Extern DNA-kontroll)	23 av 24 angivna varianter detekterades	Ogiltigförklara patientprover manuellt baserat på kontrollprovsresultat. Analysmodulen ogiltigförklarar inte patientprover automatiskt baserat på kontrollprovsresultat.
	RNA External Control (Extern RNA-kontroll)	12 av 13 angivna varianter detekterades	
Kontroll utan mall	DNA-medianexontäckning för TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Ogiltigförklara patientprover manuellt baserat på kontrollprovsresultat. Analysmodulen ogiltigförklarar inte patientprover automatiskt baserat på kontrollprovsresultat.
	RNA – gen ovanför medianbrytvärdet	≤ 1	

* Lyckade resultat visas som PASS (GODKÄND).

- Upprepa sekvenseringskörningar som är ogiltiga.
- Upprepa bibliotekstester med följande resultat:
 - Kontaminerade DNA-bibliotek
 - Ogiltiga RNA-bibliotek
 - Tester kan upprepas för att erhålla fler variant- eller biomarkörresultat för DNA-bibliotek som ogiltigförklarades för en men inte alla varianttyper.
- Positiva kontroller utvärderas för variantbestämning. Ogiltigförklara sekvenseringskörningen manuellt om positiva kontroller inte uppfyller specifikationerna för variantbestämning. Analysmodulen ogiltigförklarar inte patientprover automatiskt baserat på kontrollprovsresultat.
- NTC:er utvärderas mot medianexontäckningen för DNA och gener ovanför medianbrytvärdet för RNA. Om negativa kontroller inte uppfyller specifikationerna ska du ogiltigförklara biblioteksprepareringshändelsen och alla tillhörande sekvenseringskörningar manuellt. Analysmodulen ogiltigförklarar inte patientprover automatiskt baserat på kontrollprovsresultat.
- Utför ytterligare kvalitetskontrollsmätningar i enlighet med lokala, nationella och/eller federala föreskrifter eller ackrediteringskrav.

Mer information om att upprepa sekvenseringskörningar eller tester av bibliotek finns i [Felsökning på sidan 84](#).

Felsökning

Använd följande tabell för att felsöka problem i arbetsflödet. Ytterligare felsökning krävs om en sekvenseringskörning eller bibliotekspreparering för ett prov misslyckas två gånger. Kontakta Illumina tekniska support.

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Sekvenseringskörningen blir inte godkänd i kvalitetskontrollen.	- Fel vid poolning - Fel vid spädning - Ofullständig värmedenaturering av PRL/PDL - Problem med beredning av förbrukningsmaterial för sekvensering (t.ex. inte tillräckligt tinat, kondens/smuts på flödescellen)	Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 73.
	- Felaktig användning av anrikningsprober (till exempel OPR1-prober som används för DNA-prover, OPD2-prober som används för RNA-prover) - Fel i arbetsflödet för biblioteksberedning under eller efter det första hybridiseringssteget.	Upprepa anrikningsstegen för bibliotek från PCR-plattan ALS (amplifierade biblioteksprover). Se Starta den första hybridiseringen på sidan 58.
	Provkraven uppfylldes inte	Starta biblioteksprepareringen från arbetsflödets början. Se Denaturera och hybridisera RNA på sidan 44 eller Fragmentera gDNA på sidan 49 .

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Fel vid rapportgenerering eller allmänt instrumentfel (nätverksfel, fel vid in-/utmatning av reagenser osv.).	Fel i arbetsflödet för biblioteksberedning under eller före index-PCR-steget	Upprepa anrikningsstegen för bibliotek från PCR-plattan ALS (amplifierade biblioteksprover). Se Starta den första hybridiseringen på sidan 58 .
	Instrumentfel	Kontakta Illumina tekniska support.
	Programvaru- eller instrumentfel.	Se Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661) för hjälp med rapportgenerering. Kontakta Illumina tekniska support för att få ytterligare hjälp.
DNA-biblioteket blir inte godkänt i kvalitetskontrollen.	Provkraven uppfylldes inte.	Säkerställ att lämpliga prover används och upprepa biblioteksprepareringen från steget Fragmentera gDNA. Se Provkrav på sidan 27 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28 .
	Användnings- eller utrustningsfel i analysarbetsflödet	Upprepa biblioteksprepareringen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illumina tekniska support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod. • Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 73. • Upprepa anrikningsstegen för bibliotek från PCR-plattan ALS (amplifierade biblioteksprover). Se Starta den första hybridiseringen på sidan 58. • Starta biblioteksprepareringen från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 49.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
	Kriterierna CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_ VALUE uppfylls inte.	Mer information om att undvika korskontaminering finns i avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder. Granska plattlayouten och biblioteksindexeringen för att säkerställa att bibliotek med samma index inte sekvenserades tillsammans. Starta biblioteksprepareringen av påverkade bibliotek från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 49 . Kontamination kan ha uppstått vid provextraktion. Eventuellt måste extraktionen upprepas för att säkerställa att provet inte är kontaminerat.
	Användbar MSI misslyckades.	Följ ultrasonikatortillverkarens inställningar för användning och drift (inklusive vattennivå och rörtyp). Säkerställ att rätt prover används i analysen. Se Provkrav på sidan 27 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28 . Eventuellt måste en ny provextraktion utföras och/eller steget Fragmentera gDNA upprepas om provet är för fragmenterat eller skadat.
	Provet är alltför fragmenterat eller har nukleinsyreskador som påverkar förmågan att generera tillräckligt med unika bibliotek.	Granska Konfigurationsinställningar för ultrasonikator för DNA-fragmentering på sidan 24 och ultrasonikator tillverkarens inställningar för användning och drift (inklusive vatten nivå och rörtyp). Säkerställ att rätt prover används i analysen. Se Provkrav på sidan 27 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28 . Eventuellt måste en ny provextraktion utföras och/eller steget Fragmentera gDNA upprepas om provet är för fragmenterat eller skadat.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
RNA-biblioteket blir inte godkänt i kvalitetskontrollen.	Provkraven uppfylldes inte.	Säkerställ att lämpliga prover används och upprepa biblioteksprepareringen från steget Denaturera och hybridisera RNA. Se Provkrav på sidan 27 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28 .
	Användnings- eller utrustningsfel i analysarbetsflödet	Upprepa bibliotekspreparationen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illumina tekniska support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod. • Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 73. • Upprepa anrikningsstegen för bibliotek från PCR-plattan ALS (amplifierade biblioteksprover). Se Starta den första hybridiseringen på sidan 58. • Starta biblioteksprepareringen från arbetsflödets början. Se Denaturera och hybridisera RNA på sidan 44.
	Provet är alltför fragmenterat eller har nukleinsyra skador som påverkar förmågan att generera tillräckligt med unika bibliotek.	Säkerställ att rätt prover används. Se Provkrav på sidan 27 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 28 . Eventuellt måste en ny provextraktion utföras om provet är för fragmenterat eller skadat.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Fel med positiv kontroll (DNA/RNA).	Provkraven för den positiva kontrollen uppfyllides inte.	Säkerställ att rätt prover används i analysen. Granska plattlayouten och säkerställ att rätt reagenser (prober, index) är i rätt brunnar. Kontrollera att det positiva kontrollprovet förvaras i enlighet med märkningen. Upprepa bibliotekspreparationen för alla prover som delar den positiva kontrollen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illumina tekniska support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod.
	Användnings- eller utrustningsfel i analysarbetsflödet	• Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 73. • Upprepa anrikningsstegen för bibliotek från PCR-plattan ALS (amplifierade biblioteksprover). Se Starta den första hybridiseringen på sidan 58. • Starta biblioteksprepareringen från arbetsflödets början. Se Denaturera och hybridisera RNA på sidan 44 eller Fragmentera gDNA på sidan 49.
NTC-fel (DNA/RNA).	Korskontamination uppstod eller kontamination av arbetsområdet.	Mer information om att dekontaminera arbetsområden och undvika korskontaminering finns i avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder. Granska plattlayouten och biblioteksindexeringen för att säkerställa att bibliotek med samma index inte sekvenserades tillsammans. Upprepa bibliotekspreparationen från arbetsflödets början för alla bibliotek som delar kontroll utan mall.
	Felaktig indexering av bibliotek.	

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Programvaran indikerar att positiva och/eller negativa kontroller inte inkluderades i sekvenseringskörningen.	Felaktig tilldelning av cancertyp i körningsplaneringen i Local Run Manager (lokal körningshanterare).	Upprepa analys med kontroller korrekt identifierade enligt instruktionerna i Arbetsflödesguiden för analysmodul (se <i>Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661)</i>).

Prestandaegenskaper

TSO Comprehensive (EU) är en riktad NGS-panel som detekterar förändringar i 517 gener. Små DNA-varianter (enkelnukleotidvarianter [SNVs], multinukleotidvarianter [MNVs], insertioner och deletioner) är kvalificerade för rapportering från alla 517 gener. Tumörmutationsbörda rapporteras som en poäng baserat på ett antal icke-drivande somatiska varianter per megabas (se *Arbetsflödesguide för Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr 200008661)* för ytterligare information). MSI rapporteras som en status. Genamplifieringar är kvalificerade för rapportering från generna MET och ERBB2. Fusioner är kvalificerade för rapportering från de 23 generna som anges i [Sammanfattning och förklaring av analysen på sidan 1](#). Splicevarianter är kvalificerade för rapportering från generna MET och EGFR. Varianter måste ha evidens i TSO Comprehensive (EU)-analysens kunskapsbas och vara kvalificerade baserade på den testade vävnadstypen för att rapporteras. För att rapporteras kräver NTRK-fusioner att fusionspartnern är 5' och att NTRK-kinasdomänen är intakt.

För små DNA-varianter genomfördes ett representativt tillvägagångssätt för validering av de riktade generna i panelen med data som representerade SNV:er, MNV:er, insertioner och deletioner. För genamplifieringar, fusioner och splicevarianter genomfördes testning på gennivå. TMB och MSI utvärderades där så anges. För CDx-påståendet för NTRK testades fusioner i FFPE-prover i studier fokuserade på prestanda som är specifika för påståendet (dvs. detektionsgräns, laboratoriets precision, reproducerbarhet, noggrannhet och kliniska prestanda).

[Tabell 42](#) visar definitioner av mått beräknade i olika studier.

Tabell 42 Definitioner av mått

Term	Benämning
Positiv procentuell överensstämmelse (PPA)	Procentandelen positiva resultat , korrekt identifierade från det totala antalet positiva resultat i förhållande till en ortogonal metod.
Negativ procentuell överensstämmelse (NPA)	Procentandelen negativa resultat korrekt identifierade från det totala antalet negativa resultat i förhållande till en ortogonal metod.

Term	Benämning
Total procentuell överensstämmelse (OPA)	Procentandelen positiva och negativa resultat korrekt identifierade från den totala observationen i förhållande till en ortogonal metod.
Positiva bestämningar i procent (PPC)	Procentandelen observationer som är positiva för ett mål bland observationer som förväntas vara positiva för målet.
Negativa bestämningar i procent (PNC)	Procentandelen observationer som är negativa för ett mål bland observationer som förväntas vara negativa för målet.
n/N	Antalet positiva eller negativa observationer (n), dividerat med det totala antalet observationer (N) för att beräkna PPC respektive PNC. Värdena för n och N kan vara på olika nivåer (t.ex. variant eller gen) eller kombineras över en grupp (t.ex. SNV).
Standardavvikelse (SD)	Ett mått på variationen av värdena för en variabel om dess medelvärde.
Variationskoefficient i procent (%CV)	Standardavvikelse dividerad med medelvärdet i procent.

Korskontaminering

Studien av korskontaminering utfördes för att utvärdera om falskt positiva resultat orsakades av kontaminering mellan brunnar under provbibliotekspreparering eller kontaminering mellan på varandra följande sekvenseringskörningar. Denna analys gjordes för små DNA-varianter (som även påverkar TMB), fusioner, genamplifieringar och MSI. Bibliotek bereddes utifrån kartlagda prover i ett rutnär med alternerande prover för att utvärdera kontaminering mellan brunnar samt med alternerande index för att utvärdera kontaminering mellan sekvenseringskörningar när de sekvenseras efter varandra på samma NextSeq 550Dx-instrument. Inga kontamineringshändelser observerades i studien av korskontaminering, där de identifierade varianterna i varje prov undersöktes och inga falskt positiva resultat hittades.

Två kvalitetskontrollmått (CONTAMINATION_SCORE och P_VALUE) utformades för TSO Comprehensive (EU)-analysen för att detektera provkontaminering i DNA-prover. Sensitiviteten för detektering av kontaminering utvärderades. FFPE-tumör-DNA-prover blandades med varierande mängder FFPE-normal DNA-prover för att skapa avsiktligt kontaminerade prover.

Totalt genererades 1 112 kontamineringsobservationer och kontaminering detekterades i 95 % (1 054) av observationerna. Detektionsfrekvensen ökades till 96 % (939/976) när andelen kontaminering var mellan 10 % och 90 % (massa/massa). Av de 37 observationerna mellan 10 % och 90 % kontaminering där kontaminering inte detekterades uppfyllde 12 inte täckningsspecifikationen för att bestämma små DNA-varianter. Låg täckning hindrar detektion av kontaminering, men små DNA-varianter rapporteras inte för att mildra eventuella effekter

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

av kontaminering. Femton observationer uppfyllde inte genamplifieringsspecifikationen (kvalitetskontrollmättet medianvärde för diskreta värden) för att bestämma genamplifiering. Inget resultat för genamplifiering skulle rapporteras för proverna.

Studien visade att TSO Comprehensive (EU)-analysen förväntas ha en låg förekomst av korskontaminering från brunn till brunn eller från körning till körning. Dessa resultat, tillsammans med kontamineringsmåten i programvaran, minskar risken för falska variantresultat på grund av provkontaminering.

Utvärdering av extraktionssatser för nukleinsyra

Tre kommersiellt tillgängliga DNA- och RNA-extraktionssatser utvärderades med TSO Comprehensive (EU). De tre extraktionssatserna isolerade både DNA och RNA från samma FFPE-vävnadssektioner. Satserna skilde sig åt gällande användning av avparaffineringsmedel och bindningssteget för nukleinsyra ([Tabell 43](#)). Sats 1 var den dominerande extraktionssatsen som användes för att bestämma prestanda för TSO Comprehensive (EU).

Tabell 43 Satsegenskaper

Sats	Avparaffineringsmedel	Bindning av nukleinsyra
1	Proprietär	Kolumn
2	Xylen	Kolumn
3	Mineralolja	Magnetkolor

[Tabell 44](#) och [Tabell 45](#) sammanfattar effekterna av extraktionssatser på bibliotekets giltighet och variantbestämning. Skillnaden rapporterades om medelvärdena för extraktionssatserna var signifikant olika. Genomsnittliga skillnader mellan extraktionssatser beräknades med Sats 1 som kontroll, eftersom Sats 1 användes för att extrahera de flesta nukleinsyror som användes för analytiska studier med TSO Comprehensive (EU). Den genomsnittliga skillnaden i förhållande till Sats 1 rapporterades för att illustrera hur olika extraktionssatser skulle påverka de andra analytiska studierna med TSO Comprehensive (EU).

Tabell 44 Extraktionssatsens påverkan på bibliotekets giltighet

Varianttyp	Mått för kvalitetskontroll av bibliotek	Genomsnittlig skillnad i förhållande till Sats 1
Små DNA-varianter/TMB	Medianexontäckning (antal)	Sats 2 lägre med 56 avläsningar
	PCT Exon 50X (%)	Sats 3 högre med 0,298 %
	Medianinsättningsstorlek (bp)	Sats 2 och Sats 3 lägre med 3 bp
DNA MSI	Användbara MSI-platser	Sats 3 högre med 8 platser
DNA-genamplifieringar	Mediantäckning (antal)	Sats 2 lägre med 0,0043
	Medianvärde för diskreta värden	Sats 2 lägre med 0,5825, Sats 3 högre med 0,3086
RNA (fusioner/splicevarianter)	Medianinsättningsstorlek (bp)	Sats 3 högre med 2 bp
	Logg (median-CV Gene500X)	Sats 2 högre med 0,029
	Målavläsningar totalt	Ingen signifikant skillnad

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Extraktionssatserna 2 och 3 observerades ha ökade stödavläsningar, så att fusioner och splicevarianter nära LoD har en högre sannolikhet för detektion på grund av val av extraktionssats.

Tabell 45 Extraktionssatsens påverkan på variantbestämning

Varianttyp (enheter)	Variantbestämning (genomsnittlig skillnad i förhållande till Sats 1)
Små DNA-varianter (VAF)	Ej tekniskt signifikant Riktade varianter: variansen mellan satser var liten i förhållande till residual Ej riktade varianter: Inga signifikanta skillnader för de två första VAF-grupperna med diskreta värden. Inga meningsfulla skillnader när statistisk signifikans observeras.
TMB (mutation per megabas)	Ej tekniskt signifikant, variansen mellan satser var liten i förhållande till residual
MSI (% instabila platser)	Sats 3 lägre med 1,9 % instabila platser
Genamplifiering (veckningsförändring)	Sats 2 (0,06) och Sats 3 (0,08) har högre veckningsförändring
Fusion (stödavläsningar)	Sats 2 hade 51 % och Sats 3 hade 23 % ökning av stödavläsningar
Splicevarianter (stödavläsningar)	Sats 2 och Sats 3 hade 48 % ökning av stödavläsningar

Interfererande substanser

Effekten av potentiella endogena och exogena substanser på prestandan för TSO Comprehensive (EU)-analysen utvärderades. Endogena substanser (melanin och hemoglobin) tillsattes i proverna under extraktionsprocessen för nukleinsyra. Exogena substanser (etanol, xilen och proteinas K) var närvarande under extraktionsprocessen för nukleinsyra, och de tillsattes även i den renade nukleinsyran innan biblioteksprepareringen. Där interferens observerades med tillsatt proteinas K utvärderades även ökade koncentrationer av proteinas K under extraktionsprocessen. Överskott av indexprimrar (15 % och 30 %) tillsattes under biblioteksberedningen. Förutom för indexprimrar tillsattes substanser till FFPE-vävnadsprover från hjärna, bröst, kolon, lunga, medullär sköldkörtel, NSCLC, äggstock, prostata, saliv, hud, mjukvävnad och sköldkörtel – åtta prover extraherades för DNA-analys och 13 extraherades för RNA-analys. För indexprimrar användes sex FFPE-prover från tre olika vävnadstyper (sköldkörtel, urinblåsa, kolon) för DNA-analys, och fem FFPE-prover från fyra olika vävnadstyper (lunga, sköldkörtel, kolon, bröst) användes för RNA-analys. Det fanns en endogen kontroll utan tillsats, och buffert eller vattenspikad exogen kontroll för vart och ett av de 16 unika proverna. Effekten av nekros bedömdes på en annan uppsättning av åtta FFPE-prover från hjärn-, kolon- och lungvävnader. Det fanns en makrodissekerad kontroll utan nekros för varje nekrosprov. För alla interferenter testades fyra replikat per prov per substans med TSO Comprehensive (EU)-analysen och jämfördes med respektive kontrolltillstånd för detektion av små DNA-varianter, genamplifieringar, RNA-fusioner och RNA-splicevarianter, samt för MSI-status och TMB-resultat. Både CDx- och tumörprofileringsvarianter inkluderades.

Detektion av DNA-varianter

Melanin (0,2 µg/ml), hemoglobin (2 mg/ml), etanol (5 %), proteinas K (0,04 mg/ml i nukleinsyra) och xylen (0,0001 %) stör inte TMB-resultat, MSI-status, små DNA-varianter och genamplifieringar.

Detektion av RNA-varianter

Data stöder ingen interferens av melanin (0,2 µg/ml), etanol (5 %) och xylen (0,0001 %) för RNA-fusioner eller splicevarianter. Hemoglobin (2 mg/ml) interfererade (minskade stöдавläsningar) med tre olika splicevarianter i MET-genen. En splicevariant i AR-genen (tre olika prover) och en i EGFR-genen (ett prov) påverkades inte. Om laboratoriet kör RNA med analysen ska vävnad med hemoglobin undvikas eller minimeras när snitt tas från vävnadsblocket.

Proteinas K (0,04 mg/ml i nukleinsyra) interfererade med RNA-fusioner och splicevarianter. Proteinas K testades vid 2,6 mg/ml och 5,2 mg/ml under extraktionsprocessen, vilket är 2x och 4x standardkoncentrationen i en kommersiellt tillgänglig sats. Fusioner hämmades vid 4x, men inte 2x proteinas K. Splicevarianter hämmades vid 2x proteinas K. Proteinas K eller motsvarande enzym ska inte ökas under extraktion från standardkoncentrationen som tillhandahålls i en extraktionssats.

Avläsningar, som stödjer splicevariant, minskar med 30 % överskott av indexprimrar men inte med 15 % överskott.

Nekros

Närvaron av nekrotisk vävnad upp till 70 % störde inte TMB-resultat, MSI-status eller små DNA-varianter. RNA-varianter (stöдавläsningar) och genamplifieringsdetektion (veckningsförändring) minskades i prover med ≥ 25 % respektive ≥ 23 % (efter område) nekrotiskt innehåll i vävnadsområdet. Om provområdena innehåller ≥ 23 % nekros i den totala vävnadsarean, måste den nekrotiska vävnaden makrodissekeras.

Stabilitet

Stabilitet i realtid

Stabilitet i realtid användes för att fastställa TSO Comprehensive (EU)-analyssatsens hållbarhetstid vid förvaring i enlighet med villkoren som anges på märkningen. Studieutformningen baserades på testning av tre partier med reagenser och använde den klassiska stabilitetsstudieutformningen som beskrivs i CLSI EP25-A. Satserna lagrades i slutlig kittad konfiguration under hela studien, vid förvaringsförhållanden som anges på produktetiketten. Frysta satskomponenter förvarades vid -15 °C till -25 °C. Kylde satskomponenter förvarades vid 2 °C till 8 °C.

Satserna testades för utseende- och funktionskriterier vid angivna tidpunkter. Dessutom analyserades trender för variantbestämning och provers kvalitetskontrollmått för kvalitetskontrollmaterialet. Hållbarheten bestämdes för varje reagens. Utgångsdatum tilldelas baserat på tillverkningsdatum och hållbarhetstid. Satsers utgångsdatum tilldelas baserat på det reagens som har tidigast utgångsdatum.

Satsstabilitet vid användning

TSO Comprehensive (EU)-analyssatsens stabilitet vid användning utvärderades vid standardförhållanden och vid olika tillfällen under hållbarhetstiden för att se om det fanns stöd för flera användningar. Reagenssatsen utsattes för flera frysnings-/tiningscykler och testades för att stödja upp till fyra användningar. Dessutom bereddes åtta RNA-bibliotek och åtta DNA-bibliotek totalt tre gånger för att testa maximalt antal bibliotek som stöds (24 DNA-bibliotek och 24 RNA-bibliotek per sats). Alla funktionskriterier i kvalitetskontrollen uppfylldes för alla frysnings-/tiningscykler och vid alla tidpunkter som testades. Testning av FFPE-prover med reagens i åldern ≥ 25 månader utfördes för att bedöma effekten av tester under användning för variantbestämning. En kvalitativ analys av riktade varianter visar att händelserna under användning inte påverkade variantbestämningen.

Stabilitet hos nukleinsyra

Stabiliteten hos nukleinsyror (DNA och RNA) och deras associerade kvantifiering för användning med TSO Comprehensive (EU)-analysen utvärderades med FFPE-prover från flera vävnadstyper. FFPE-block snittades och alla nukleinsyror extraherades på en gång. Extraherad nukleinsyra blandades noggrant, kvantifierades, kontrollerades med avseende på nukleinsyrakvalitet och alikvoterades i två uppsättningar med engångsrör som skulle frysas vid två tidpunkter: T0-kontroll (baslinje) och T1-test (≥ 28 dagar). Allt extraherat RNA förvarades vid -85°C till -65°C och allt extraherat DNA förvarades vid -25°C till -15°C under de angivna tidsperioderna och bearbetades sedan genom TSO Comprehensive (EU)-analysen på flera replikat och operatörer. T1-testtillståndet jämfördes med kontrollen för MSI-status, TMB-resultat, genamplifieringar, små DNA-varianter, RNA-fusioner och RNA-splicevarianter. Data indikerar att nukleinsyror och deras associerade kvantifiering för användning med TSO Comprehensive (EU)-analysen är stabila i upp till 28 dagar vid förvaring vid rekommenderade temperaturer (RNA vid -85°C till -65°C och DNA vid -25°C till -15°C).

Biblioteksstabilitet

Stabiliteten hos bibliotek som använde var och en av de sex säkra stoppunkterna för analysen (se [Tabell 5](#)) utvärderades med FFPE-prover från flera vävnadstyper. Kontrollbibliotek (T0, inga stoppunkter) sekvenserades omedelbart i slutet av arbetsflödet. Alikvoter från samma bibliotek hölls vid stoppunkterna vid -25°C till -15°C under tiden (T1), för att stödja de dagar som anges i [Tabell 5](#). T1 jämfördes med T0 för små DNA-varianter, TMB, genamplifieringar, MSI, RNA-fusioner och RNA-splicevarianter med CDx- och tumörprofileringsvarianter. Data indikerar att bibliotek, som genereras från TSO Comprehensive (EU)-analysen, är stabila i enlighet med bruksanvisningen.

Stabilitet hos FFPE-vävnad fäst på objektglas

Stabiliteten hos FFPE-vävnader fästa på objektglas för användning med TSO Comprehensive (EU)-analysen, utvärderades genom att FFPE-block (5 μm sektioner) från olika unika prover, som fästes på objektglas och därefter förvarades vid rumstemperatur (22°C) vid två tidpunkter. RNA extraherades och förvarades vid -65°C till -85°C och DNA extraherades och förvarades vid -15°C till -25°C i mindre än 1 vecka före testning. Nukleinsyramaterialet kvantifierades och bearbetades sedan genom TSO Comprehensive (EU)-analysen inom 24 timmar för varje tidpunkt. Vid varje tidpunkt testades flera replikat och operatörer per prov med TSO

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Comprehensive (EU)-analysen och jämfördes sedan med T0-tidpunkten för MSI, TMB, genamplifieringar, små DNA-varianter, RNA-fusioner och RNA-splicevarianter, inklusive CDx- och tumörprofileringsvarianter. Variantbestämning bedömdes och uppfyllde alla godkännandekriterier, vilket indikerar att FFPE-vävnader som fästs på objektglas för användning med TSO Comprehensive (EU)-analysen är stabila vid rumstemperatur i upp till 4 veckor (28 dagar). Observera att en 10 % minskning av MSI-bibliotekets QC-giltighetsgrad upptäcktes efter fyra veckor (28 dagar) på grund av en kombination av operatör och förvaringstid. RNA-fusioner och splicevarianter hade en ca 29 % minskning av stödjande avläsningar efter förvaring på objektglas i fyra veckor (28 dagar).

Tröskelvärde vid titrering av nukleinsyra

Nukleinsyra som används i TSO Comprehensive (EU)-analysen utvärderades genom tester av DNA från 33 FFPE-prover som omfattade 17 vävnadstyper vid inmatningsnivåer från 10 ng till 500 ng samt tester av RNA från fem FFPE-prover från fem vävnadstyper vid inmatningsnivåer från 10 ng till 85 ng. Bibliotekets kvalitetskontrollmått utvärderades och var provberoende. DNA-resultaten visade att vissa men inte alla kvalitetskontrollmått för DNA-prover svarar på ökad inmatning över den nominella inmatningen på 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE svarade inte på inmatning över 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE visade ett positivt samband med ökande inmatning.
- PCT_EXON_50X ökade med ökande inmatning upp till 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES ökade med ökande inmatning. Vissa prover med färre än 40 USABLE_MSI_SITES vid 40 ng uppfyllde specifikationen vid högre inmatningar, vilket skulle göra det möjligt att beräkna ett MSI-resultat.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET ökade med ökande inmatning.
- Ökad inmatning för att öka COVERAGE_MAD mot den övre specifikationsgränsen.

RNA-provernans kvalitetskontrollmått ökade (MEDIAN_INSERT_SIZE och TOTAL_ON_TARGET_READS) eller minskade (MEDIAN_CV_GENE_500X) från 10 ng till 40 ng men ändrades i allmänhet inte vid en inmatning mellan 40 ng och 85 ng.

Gräns för blankprov

Procentandelen falska positiva (av totalt förväntade negativa) bedömdes med hjälp av replikattestning av normal eller benign FFPE, intilliggande vävnad som inte borde innehålla somatiska varianter för små DNA-varianter, genamplifieringar, MSI, RNA-fusioner och RNA-splicevarianter. Falskt positiva resultat analyserades inte för TMB eftersom det inte förekommer något kliniskt brytvärde. Två operatörer körde sex DNA-prover och sex RNA FFPE-prover i två omgångar under tre dagar med båda av de två reagenspartierna. En del av proverna samlades i en uppsättning och omsekvenserades igen i ett 3x-endast-DNA-format och ett 3x-endast-RNA-format för att utvärdera falskt positiva värden med flera multiplexkonfigurationer som den här enheten stöder. Dessutom kördes ytterligare 30 RNA-prover i två omgångar som bearbetades med ett reagensparti, uppdelat mellan två operatörer. Totalt fanns det 168 möjliga observationer för DNA och 228 observationer för RNA, reducerat av ogiltiga bibliotek för varje varianttyp. Procentandelen falskt positiva värden

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

beräknades på gennivå för amplifieringar och på positionsnivå (cirka 1,9 miljoner positioner) för små DNA-varianter. Procentandelen falskt positiva för DNA-varianttyper visas i [Tabell 46](#). TSO Comprehensive (EU) har inga CDx-påståenden (nivå 1) för små DNA-varianter, så inga små DNA-varianter falskt positiva kan rapporteras för nivå 1. De 271 falska positiva utjämnades av TSO Comprehensive (EU)-kunskapsbasen. Inga falskt positiva resultat var kliniskt signifikanta (nivå 2). Det fanns fyra falska positiva resultat i nivå 3, som härrörde från två varianter över 4 (2,4 %) observationer av de 168 observationerna. Procentandelen av falskt positiva värden för RNA-fusion och splicevarianter var 0 %, vilket visas i [Tabell 47](#).

Tabell 46 Falskt positiva värden enligt typ av DNA-variant

Varianttyp	Falskt positiva värden
Genamplifieringar	0 % (0/9912)
Små DNA-varianter	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Ej tillämpligt*

* Falskt positiva värden är inte tillämpligt eftersom TMB rapporteras som en bedömning och inte har ett kvalitativt resultat.

Tabell 47 Falskt positiva värden efter RNA-varianttyp

Varianttyp	Falskt positiva värden
Fusion	0 % (0/227)
Splicevariant	0 % (0/227)

Detektionsgräns

Två studier genomfördes för att bedöma detektionsgränserna för TSO Comprehensive (EU). Studie 1 utvärderade små RET DNA-varianter, RET-fusioner och NTRK1–3-fusioner. Studie 2 utvärderade andra tumörprofileringsvarianter.

Studie 1

Detektionsgränserna (LoD) för NTRK1, NTRK3 och små RET-DNA-varianter samt NTRK1-3- och RET-fusioner bestämdes. LoD är det lägsta analysvärdet (t.ex. variantallelfrekvens eller avläsningar som stöds) som kan detekteras konsekvent (95 % detektionsgräns eller ett typ II-fel på 5 %). FFPE-vävnader med små RET-DNA-varianter (medullär sköldkörtelcancer), RET-fusioner (papillär sköldkörtelcancer, atypisk spetstumör) och NTRK1–3-fusioner (lågmalignt gliom, glioblastom, myofibroblastiskt sarkom, sarkom, sekretorisk bröstcancer, koloncancer), samt en FFPE-behandlad cellinje med de små DNA-varianterna NTRK1 och NTRK3 användes i studien. Varje prov späddes till minst fem testnivåer (från cirka 0,01 till 0,10 VAF för små DNA-varianter och cirka 2–25 stöдавläsningar för fusioner). Det gjordes 18 observationer för varje testnivå per parti och genererad variant av tre operatörer, och tre sekvenseringsinstrument användes för att initiera bibliotekspreparering under tre ej på varandra följande dagar med två replikat för varje provtestnivå. Två reagenspartier testades.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

För DNA-varianter analyserades de två partierna oberoende med en probitmodell eller träffsäkerhetsmetoden (lägsta testnivå med en träffsäkerhet (punktberäkningar) på $\geq 95\%$) för att bestämma LoD för varje variant per parti. Den högsta LoD för de två reagenspartierna användes som detektionsgräns för varianten ([Tabell 48](#)).

För RNA-fusioner användes FFPE-cellinjer för att uppskatta LoD-värdena för varje fusionsgen.

Detektionsgränserna (LoD) verifierades sedan av tre operatörer med FFPE-vävnader med användning av två biblioteksprepareringar, tre instrument och tre reagenspartier för att generera 54 observationer per variant nära LoD som etablerats med FFPE-cellinjer. Den påstådda detektionsgränsen för varje fusion ([Tabell 49](#)) är det lägsta medelvärdet för stödavläsningar som nådde en träffsäkerhet (punktberäkning) på $\geq 95\%$.

Tabell 48 Detektionsgräns för de små DNA-varianterna NTRK1, NTRK3 och RET

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

¹ Chr = Kromosom

² DNA-varianterna analyserades med en probitmodell. De andra DNA-varianterna analyserades med träffsäkerhetsmetoden.

Tabell 49 Detektionsgräns för NTRK- och RET-fusioner

Gen	Fusion	Detektionsgräns (stödavläsningar)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2

Gen	Fusion	Detektionsgräns (stödavläsningar)
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

De detektionsgränser (LoD) för tumörprofileringsvarianter som rapporterats av TSO Comprehensive (EU) utvärderades. LoD är det lägsta analysvärdet (variantallelfrekvens, veckningsförändring eller stödavläsningar) som kan detekteras konsekvent (95 % träffsäkerhet eller ett typ II-fel på 5 %). FFPE-prover från 17 vävnadstyper innehållande varianter spädades ut till flera testnivåer. Sex observationer genererades per nivå av två operatörer som var och en använde olika reagenspartier och instrument.

DNA-varianter

LoD (detektionsgränser) för tio små DNA-variantklasser (25 varianter totalt) och två DNA-genamplifieringar (ERBB2 och MET) bestämdes och sammanfattades som intervall ([Tabell 50](#)). RET-varianter från studie 1, LoD ingår också. Två av de tre insertionerna, som var större än 5 bp, hade LoD på 0,034 och 0,036 VAF, medan den tredje hade en LoD på 0,215 VAF. Den senare var en insertion i en region med låg komplexitet där insertioner lägger till ytterligare upprepningar, påverkar linjeringen och kräver fler avläsningar för konsekvent detektion. Därför kan vissa genomiska sammanhang med låg komplexitet påverka detektion av insertioner som är > 5 bp.

Tabell 50 Detektionsgräns för små DNA-varianter och genamplifieringar

Typ (måttenheter för LoD)	Variantklass/ genomiskt sammanhang	Antal varianter	Intervall (VAF)
Små DNA-varianter (variantallel frekvens)	SNV:er	5	0,016–0,064
	MNV:er	3	0,022–0,048
	Insertion (1–2 bp) nära homopolymerupprepningar	2	0,086–0,104
	Insertion (1–2 bp) nära dinukleotidupprepningar	2	0,038–0,051
	Insertion (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertion (> 5 bp och upp till 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deletion (1–2 bp) nära homopolymerupprepningar	2	0,094–0,100
	Deletion (1–2 bp) nära dinukleotidupprepningar	2	0,033–0,070
	Deletion (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Deletion (> 5 och upp till 25 bp)	2	0,047–0,055
Genamplifiering (förändring)	Efter gen (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analys av icke-riktade varianter utfördes från studie 1-prover som hade minst fem testnivåer. Varje icke-målinriktad variant analyserades individuellt och en LoD uppskattades endast för varianter med minst en nivå >0 % och ≤ 95 % träffsäkerhet och minst en nivå ≥ 95 % träffsäkerhet. [Tabell 51](#) visar percentiler tillsammans med minsta och högsta LoD som observerats per klass för de icke-riktade varianterna. De icke-riktade varianterna ger fler varianter per klass än de som testades i studie 2, och överensstämmer med LoD-intervallen från [Tabell 50](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 51 Sammanfattningsstatistik för detektionsgränser per klass av icke-målvarianter (från studie 1)

Klass	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

Fusioner

LoD bestämdes för 19 fusioner, vilket omfattar 20 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelen, som varierade från 9 till 31,3 stödavläsningar ([Tabell 52](#)). Ytterligare tre gener (NTRK1–3) testades i den andra studien. RET-genen testades i den andra studien. 16 fusioner med fastställda LoD hade data som överensstämde med en gemensam LoD på 16 stödavläsningar med ett 95 % övre konfidensintervall (UCL) med två sidor. Två fusioner hade LoD på 24,7 och 31,3 stödavläsningar, som inte överensstämde med den gemensamma LoD.

Fusionen FGFR2-SRPK2 med ett LoD-värde på 24,7 stödavläsningar hade upprepade överlappande regioner i brytpunkten enligt analysprogrammet TSO Comprehensive (EU). Upprepade regioner inom en brytpunkt har vanligtvis lägre bevisnivåer eftersom avläsningar kan kartläggas någon annanstans i genomet eller kan förbli ej linjerade. Dessutom gör upprepade regioner sammansättningsprocessen (används för att identifiera fusionssekvenser) mer utmanande och kräver ytterligare bevis för att konstruera den korrekta sekvensen. SEPT14-EGFR är ett annat exempel på en fusion med homolog sekvens i brytpunkten.

Fusionen BCL2-IGHJ5 med ett LoD-värde på 31,3 stödavläsningar hade en mycket kort gen (IGHJ5) med brytpunkten nära början av en exon som kräver korta linjeringar med mellanrum. Därför krävdes fler avläsningar för konsekvent detektion.

Tabell 52 Detektionsgräns för fusioner

Fusion	Gen A brytpunkt	Gen B brytpunkt	LoD	Gemensam LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	ja
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	ja
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	ja
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	ja
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	ja
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ja
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	ja
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ja
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	ja
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	ja

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

Splicevarianter

De två RNA-splicevarianterna MET och EGFR hade LoD på 18,7 respektive 16,7.

Tumörinnehåll

Resultaten i studien ger rekommendationer för tumörinnehåll för kliniska prover. Generellt gäller det att ju större tumörinnehållet är, desto högre är signalen (VAF, veckningsförändring eller stödläsningar) för varianter i tumören. Rekommendationer för minsta tumörinnehåll baseras på följande observationer. LoD-värden för små DNA-varianter är inte större än 0,104 VAF (med undantag för TP53-insertionen). För att upptäcka drivande mutationer i tumören (0,50 variantallelfrekvens) rekommenderas 20 % tumörinnehåll, för att dessa mutationer ska ha ett 0,10 VAF och vara vid eller över LoD. Vid 20 % tumörinnehåll skulle gener amplifierade till 5,5 veckningsförändring (11 kopior) detekteras konsekvent baserat på en detektionsgräns på 1,8 veckningsförändring. Vid 20 % tumörinnehåll skulle fusioner med 74 stödläsningar detekteras konsekvent baserat på en detektionsgräns på 14,7 stödläsningar.

Reproducerbarhet

Två studier utfördes för att utvärdera reproducerbarheten för TSO Comprehensive (EU)-analysen. Studie 1 utvärderade små RET DNA-varianter samt NTRK- och RET-fusionsvarianter. Studie 2 utvärderade ytterligare tumörprofileringsvarianter.

Studie 1

Den här studien utfördes för att bedöma reproducerbarheten av TSO Comprehensive (EU)-analysen för tre testplatser (en intern, två externa) med två operatörer per plats, två replikat inom en körning och tre icke på varandra följande testdagar. Testning utfördes med en reproducerbarhetspanel inklusive DNA-prover innehållande specifika kända små RET DNA-varianter och RNA-prover innehållande NTRK1-3- och RET-fusionsvarianter från formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) vävnadsprover och cellinjer. Panelen

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

innehöll DNA- och RNA-paneldeltagare med låga variantnivåer och höga variantnivåer med samma antal paneldeltagare på låg och hög nivå för varje variantklass. Paneldeltagare på hög nivå var riktade på ungefär två till tre gånger LoD och paneldeltagare på låg nivå riktades mot ungefär LoD. På varje plats testade varje operatör paneldeltagarna i duplikat tre gånger, vilket genererade sex observationer per mål och paneldeltagare. Från alla tre platserna genererades 36 observationer per paneldeltagare (tre platser/instrument × två operatörer × två replikat inom en körning × tre startdagar).

PPC och PNC för riktade små DNA-varianter och riktade RNA-fusionsvarianter på hög nivå bestämdes som primära slutpunkter. PPC och PNC för riktade små DNA-varianter och riktade RNA-fusionsvarianter på låg nivå beräknades som sekundära slutpunkter. Det tvåsidiga 95 % konfidensintervallet (KI) förknippade med alla slutpunkter beräknades med Wilson Score-metoden. Primära analyser utfördes för att uppskatta PPC och PNC (med tillhörande 95 % KI) i riktade paneldeltagare på hög nivå genom att kombinera observationer från TSO Comprehensive (EU)-analysen för ett givet mål i en grupp paneldeltagare som representerar den tillämpliga variantklassen (dvs. små DNA-varianter och RNA-fusioner) för platser/instrument, operatörer och körningar. För varje riktad variant kombinerades TSO Comprehensive (EU)-analysobservationer i andra paneldeltagare på den höga nivån som var riktade på samma varianttyp men som inte innehöll samma variant som bestämts av majoritetsregeln till beräknad PNC. Total PPC och PNC för de riktade paneldeltagarna på låg nivå bestämdes på liknande sätt.

Små RET DNA-varianter

För paneldeltagare med små DNA-varianter på hög nivå var total PPC 100,0 % (207/207, 95 % KI: 98,2 % till 100,0 %) ([Tabell 53](#)). Total PNC för paneldeltagare med små DNA-varianter på hög nivå var 100,0 % (1 035/1 035, 95 % KI: 99,6 % till 100,0 %) ([Tabell 54](#)). För små DNA-varianter hos riktade paneldeltagare på låg nivå var total PPC 99,1 % (210/212, 95 % KI: 96,6 % till 99,7 %), och total PNC var 100,0 % (1 026/1 026, 95 % KI: 99,6 % till 100,0 %).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 53 PPC för TSO Comprehensive (EU)-analys för detektion av små RET DNA-varianter hos riktade paneldeltagare på hög och låg nivå

Variantnivå	Varianttyp	Riktad variant (nukleotid)	Riktad variant (amino-syra)	N	Genomsnittlig VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95 % KI ²
~2–3 x 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)
	Alla små DNA-varianter höga	Alla små DNA-varianter höga	Alla små DNA-varianter höga	207	Ej tillämpligt ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1 x 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)
	Alla små DNA-varianter låga	Alla små DNA-varianter låga	Alla små DNA-varianter låga	212	Ej tillämpligt ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Förkortningar: N/A = ej tillämpligt, VAF = variantallfrekvens.

² Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 54 PNC för TSO Comprehensive (EU)-analys för detektion av små RET DNA-varianter hos riktade paneldeltagare på hög och låg nivå

Variantnivå	Varianttyp	Riktad variant (nukleotid)	Riktad variant (amino-syra)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % KI ²
~2–3 x 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)
	Alla små DNA-varianter höga	Alla små DNA-varianter höga	Alla små DNA-varianter höga	1 035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1 x 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)
	Alla små DNA-varianter låga	Alla små DNA-varianter låga	Alla små DNA-varianter låga	1026	100,0 (1 026/1 026)	(99,6, 100,0)

¹ Alla sammanslagna observationer från kombinationer av paneldeltagarvarianter för vilka majoritetsbestämningen är negativ (riktade varianter som hyser fusioner med mindre än 50 % positiva bestämningar).

² Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 55 visar varianskomponentanalysen av variantallfrekvenser (VAF) över de cirka 36 observationerna för varje paneldeltagare. Standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten i procent (%CV, totalt och för varje källa) beräknades och presenterades för varje riktad liten RET DNA-variant.

Tabell 55 TSO Comprehensive (EU)-varienskomponentanalys av VAF i små DNA-varianter hos riktade paneldeltagare

Variantnivå	Varianttyp	Riktad variant (nukleotid)	Målvariant (aminosyra)	N	Genomsnittlig VAF	SD (%CV) per plats	SD (%CV) per operatör	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per replikat	Total SD (%CV)
~2–3 x 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)
~1 x 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- och RET-fusioner

För RNA-fusionspaneldeltagarna på hög nivå var total PPC 99,3 % (285/287, 95 % KI: 97,5 % till 99,8 %) (Tabell 56). PPC var 100 % för varje paneldeltagare på hög nivå förutom paneldeltagaren BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % KI: 81,9 % till 98,5 %]). Total PNC för RNA-fusionspaneldeltagare på hög nivå var 100,0 % (1 724/1 724, 95 % KI: 99,8 % till 100,0 %) (Tabell 57). För de riktade RNA-fusionspaneldeltagarna på låg nivå var total PPC 95,4 % (272/285, 95 % KI: 92,3 %, 97,3 %) och total PNC var 100,0 % (1 851/1 851, 95 % KI: 99,8 % till 100,0 %).

Tabell 56 PPC för TSO Comprehensive (EU)-analysen för detektion av NTRK- och RET-fusioner hos riktade paneldeltagare på hög och låg nivå

Variantnivå	Riktade fusioner	N	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	PPC (%) (n/N)	95 % KI*
~2–3 x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alla fusioner, hög	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1 x 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)
	Alla fusioner, låg	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95 % tvåsidiga konfidensintervall (KI) beräknat med Wilson Score-metoden.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 57 PNC för TSO Comprehensive (EU)-analys för detektion av NTRK- och RET-fusioner hos ej riktade paneldeltagare på hög och låg nivå

Variant nivå	Riktade fusioner	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % KI ²
~2–3 x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4 %, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Alla fusioner – hög	1 724	100,0 (1 724/1 724)	(99,8, 100,0)
~1 x 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)
	Alla fusioner – låg	1 851	100,0 (1 851/1 851)	(99,8, 100,0)

¹ Alla sammanslagna observationer från kombinationer av paneldeltagarvarianter för vilka majoritetsbestämningen är negativ (riktade varianter som hyser fusioner med mindre än 50 % positiva bestämningar).

² 95 % tvåsidiga konfidensintervall (KI) beräknat med Wilson Score-metoden.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 58 visar varianskomponentanalysen av stöдавläsningar för de cirka 36 observationerna inom varje riktad fusion. SD och %CV (totalt och för varje källa) beräknades och presenterades för varje riktad fusion.

Tabell 58 TSO Comprehensive (EU)-varianskomponentanalys av stöдавläsningar i riktade RNA-fusionspaneldeltagare

Variantnivå	Fusion	N	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	SD (%CV) per plats	SD (%CV) per operatör	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per replikat	Total SD (%CV)
~2–3 x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9)	3,37 (9)	6,93 (18)	9,04 (24)	12,39 (33)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41)	7,87 (23)	5,40 (16)	8,95 (27)	18,98 (57)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33)	3,50 (14)	4,20 (17)	4,86 (20)	10,86 (44)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31)	4,24 (12)	6,82 (19)	6,87 (19)	15,57 (43)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20)	10,20 (18)	9,25 (16)	8,69 (15)	19,93 (35)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5)	2,65 (8)	2,16 (7)	10,47 (32)	11,11 (34)
	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13)	4,09 (11)	6,17 (17)	5,20 (14)	10,17 (28)
	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22)	2,56 (8)	6,53 (20)	5,51 (16)	11,49 (34)
~1 x 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

En andra studie utfördes för att bedöma reproducerbarheten av TSO Comprehensive (EU)-analysen på tre testplatser (två externa och en intern), två operatörer/instrument per plats, tre unika reagenspartier, fyra testdagar (icke på varandra följande) och två sekvenseringskörningar per provbibliotek.

Testning utfördes med extraherade DNA- och RNA-prover från 41 FFPE-vävnadsprover och en FFPE-cellinje (ett FFPE-vävnadsprov och FFPE-cellinjen användes för att skapa två paneldeltagare var). Vävnadsproverna bestod av följande typer: urinblåsa, ben, hjärna, bröst, kolon, jejunum, njure, lever, lunga, äggstockar, prostata, hud, mjukvävnad, mage, sköldkörtel och livmoder. Totalt 44 paneldeltagare testades, inklusive DNA-paneldeltagare med små DNA-varianter (SNV:er, MNV:er, insertioner och deletioner), genamplifieringar, olika TMB-resultat, höga MSI-resultat och RNA-paneldeltagare med fusioner och splicevarianter. De flesta paneldeltagarna hade kända målvarianter vid nivåer på cirka 2 till 3 gånger den variantspecifika detektionsgränsen (~2–3 x LoD).

LoD är analytkoncentrationen där observerade analysresultat är positiva (variant upptäckt i förhållande till TSO Comprehensive (EU)-analysens cutoff) ≥ 95 % av tiden. Genomsnittliga observerade variantnivåer kategoriserades som cirka $< 2 \times \text{LoD}$ (observerade variantnivåer vid $< 1,5 \times \text{LoD}$), ~2–3 x LoD (observerade variantnivåer vid $1,5 \times \text{LoD}$ till $3,4 \times \text{LoD}$) och cirka $> 3 \times \text{LoD}$ (observerade variantnivåer vid $> 3,4 \times \text{LoD}$).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

PPC för små DNA-varianter, genamplifieringar, MSI-High, och RNA-varianter beräknades genom att kombinera observationer för sekvenseringskörningar och platser. PNC beräknades på liknande sätt för små DNA-varianter, genamplifieringar och RNA-varianter. För varje känd riktad variant kombinerades TSO Comprehensive (EU)-analysobservationer i paneldeltagare av samma varianttyp men som innehåller andra varianter, som inte härrör från samma provkälla eller uppfyller majoritetsregeln för den varianten (< 50 % av bestämningarna var positiva) över platser, operatörer/instrument, dagar, reagenspartier och sekvenseringskörningar för att beräkna PNC. Det tvåsidiga 95 % konfidensintervallet (KI) beräknades med Wilson Score-metoden.

Små DNA-varianter

[Tabell 59](#) visar PPC för riktade små DNA-varianter. PPC varierade från 91,3 % för en BRAF SNV till 100 % för majoriteten av små DNA-varianter.

Tabell 59 PPC för TSO Comprehensive (EU)-analysen för detektion av små DNA-varianter i kombinerade riktade paneldeltagare

Observerad variantnivå ¹	Varianttyp	Riktad variant (nukleotid)	Riktad variant (amnosyra)	Genomsnittlig VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % KI ³
~2–3 x LoD	DELETION	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2–3 x LoD	DELETION	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTION	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTION	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2 x LoD	INSERTION	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2–3 x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2–3 x LoD	DELETION	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3 x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2–3 x LoD	DELETION	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTION	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU)) **illumina®**

Observerad variantnivå ¹	Varianttyp	Riktad variant (nukleotid)	Riktad variant (amino-syra)	Genomsnittlig VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % KI ³
~2–3 x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2–3 x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTION	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 x LoD	DELETION	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INSERTION	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTION	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variantnivå beräknad med den genomsnittliga observerade variantallfrekvensen.

² Den genomsnittliga variantallfrekvensen beräknad med observerade analysresultat.

³ Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

PNC var 100 % för alla små DNA-varianter.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 60 visar varianskomponentanalysen av resultaten för VAF för varje variationskälla och total variation i alla paneldeltagare med riktade små DNA-varianter.

Tabell 60 Varianskomponentanalys av VAF för riktade små DNA-varianter

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

Det fanns två riktade små DNA-varianter för vilka antalet observationer var för få för att en varianskomponentmodell skulle kunna tillämpas. För de här två riktade varianterna var den totala SD 0,027 för variant chr1_27024001_C_CG och 0,001 för variant chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genamplifieringar

Tabell 61 visar PPC för riktade genamplifieringar. PPC var 100,0 % för MET och 100,0 % för ERBB2.

Tabell 61 PPC för TSO Comprehensive (EU)-analysen för detektion av genamplifieringar i kombinerade riktade paneldeltagare

Observerad variantnivå ¹	Målvariant	Genomsnittlig observerad veckningsförändring ²	Positiva bestämningar i procent (%)	95 % KI ³
~2–3 x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Variantnivå beräknad från genomsnittlig observerad veckningsförändring.

² Genomsnittlig veckningsförändring beräknad med observerade analysresultat.

³ Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

PNC var 100 % för alla genamplifieringar.

Tabell 62 visar varianskomponentanalysen av veckningsförändringsresultaten för varje variationskälla och total variation i alla paneldeltagare med riktade genamplifieringar.

Tabell 62 Varianskomponentanalys av veckningsförändring för riktade genamplifieringar

Målvariant	N	Genomsnittlig veckningsförändring	SD (%CV) per plats	SD (%CV) per operatör (plats)	SD (%CV) per dag (plats, operatör)	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per körning	Total SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabell 63 visar PPC för riktade MSI-High-paneldeltagare. PPC var 100 % för båda MSI-High-paneldeltagarna.

Tabell 63 PPC för TSO Comprehensive (EU)-analysen för detektion av MSI-H-status i kombinerade riktade paneldeltagare

Paneldeltagare	Genomsnittligt MSI-resultat ¹	N	Positiva bestämningar i procent (%)	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)
Alla deltagare		68	100,0 % (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Genomsnittligt observerat MSI-resultat beräknat från observerade analysresultat.

² Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

Tabell 64 visar varianskomponentanalysen av MSI-resultat för varje variationskälla och total variation i alla paneldeltagare inriktade på MSI-High-status.

Tabell 64 Varianskomponentanalys av MSI-resultat för riktade MSI-High-paneldeltagare

Paneldeltagare	N	Genomsnittligt MSI-resultat	SD (%CV) per plats	SD (%CV) per operatör (plats)	SD (%CV) per dag (plats, operatör)	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per körning	Total SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

För att utvärdera reproducerbarheten av TMB-resultaten genomfördes en kvantitativ analys av resultaten i riktade TMB-paneldeltagare, som representerade en uppsättning förväntade TMB-resultat. **Tabell 65** visar varianskomponentanalysen av TMB-resultat för varje variationskälla och total variation i alla

TMB-paneldeltagare. Total SD för TMB-resultat var 1,0 (%CV = 13) för en paneldeltagare (medelvärde för TMB = 7,6) och 1,1 (%CV = 2) för en annan paneldeltagare (medelvärde för TMB = 63,2).

Tabell 65 Varianskomponentanalys av TMB-resultat för riktade TMB-paneldeltagare

Paneldeltagare*	N	Genomsnittligt TMB-resultat	SD (%CV) per plats	SD (%CV) per operatör (plats)	SD (%CV) per dag (plats, operatör)	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per körning	Total SD (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

*Det fanns en TMB-paneldeltagare för vilken antalet observationer var för få (N = 2) för att en varianskomponentmodell skulle kunna tillämpas. För den här paneldeltagaren var total SD 1,7.

RNA-varianter

Tabell 66 visar PPC för riktade RNA-varianter. PPC varierade från 91,7 % för en KIF5B-RET till 100 % för majoriteten av RNA-varianterna.

Tabell 66 PPC för TSO Comprehensive (EU)-analysen för detektion av RNA-varianter i kombinerade riktade paneldeltagare

Observerad variantnivå ¹	Varianttyp	Målvariant	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds ²	PPC (%) (n/N)	95 % KI ³
> 3 x LoD	Fusion	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 x 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)
> 3 x LoD	Splice variant	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3 x LoD	Splice variant	MET exon 14 hoppades över	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variantnivå beräknad från genomsnittliga observerade stöдавläsningar.

² Genomsnittliga stöдавläsningar beräknade med observerade analysresultat.

³ Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

PNC var 100 % för varje riktad RNA-variant, förutom för FGFR2-SRPK2-fusionen (PNC = 99,60 % [984/988], 95 % KI: 98,96 % till 99,84 %).

Tabell 67 visar varianskomponentanalysen av stödanalysresultaten för varje variationskälla och total variation i alla paneldeltagare med riktade RNA-varianter.

Tabell 67 Varianskomponentanalys av stöдавläsningar för riktade RNA-varianter

Målvariant	N	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	SD (%CV) per plats	SD (%CV) per operatör (plats)	SD (%CV) per dag (plats, operatör)	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per körning	Total SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;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, splicevariant	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET exon 14, hoppar över splicevariant	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Laboratorieprecision

Två studier utfördes för att utvärdera laboratorieprecisionen för TSO Comprehensive (EU). Studie 1 utvärderade NTRK- och RET-fusioner samt små RET DNA-varianter. Studie 2 utvärderade TMB och MSI.

Studie 1

Laboratoriets precision utvärderades för NTRK1–3-fusioner (lågmalignt gliom, glioblastom, myofibroblastiskt sarkom, sekretorisk bröstcancer), RET-fusioner (sköldkörtelcancer och hudvävnad från en okänd cancer) och små RET DNA-varianter (medullär sköldkörtelcancer) med FFPE-vävnader från de angivna cancerformerna. Varje prov testades på två variantnivåer: ~1 x LoD (låg variantnivå) och ~2–3 x LoD (hög variantnivå) med undantag för provet med CCDC6-RET som endast testades på låg variantnivå. Tre (3) operatörer körde alla

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

prover på varje testnivå i duplikat för varje biblioteksprepareringshändelse. Varje operatör startade biblioteksprepareringen på tre (3) icke på varandra följande startdagar och utförde sekvenseringen på tre (3) angivna NextSeq 550Dx-instrument. Tre (3) reagenspartier testades och genererade 54 observationer per nivå. Vissa nivåer hade färre än 54 observationer på grund av ogiltiga bibliotek.

Kvalitativ analys

Den kvalitativa konkordansen för variantbestämning utvärderades separat för de två variantnivåerna för en given variant från sammanslagna observationer från alla variabler (operatörer, reagenspartier, instrument, dagar och replikat). PPC och PNC och det associerade tvåsidiga konfidensintervallet på 95 % (Wilson score) sammanfattas i [Tabell 68](#) (små DNA varianter) och [Tabell 69](#) (RNA-fusioner).

På den höga variantnivån (~2–3 x LoD) visade TSO Comprehensive (EU)-analysen 100 % för PPC och PNC för alla testade varianter.

På den låga variantnivån (~1 x LoD) varierade PPC för små DNA-varianter från 83,3 % till 98,1 %, och PPC för RNA-fusioner varierade från 90,7 % till 100 %. För varianter med PPC < 95 % låg medelvärdet för VAF (RET C634Y och RET D898_E901del) eller stödläsningar (NCOA4-RET och BCAN-NTRK1) under respektive detektionsgränser. På låg variantnivå uppnåddes 100 % PNC för alla varianter.

Tabell 68 Kvalitativa resultat för riktade DNA-varianter

Variantnivå	Variant	Varianttyp	Genomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
~1 x 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)
	RETM918T	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)

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Variantnivå	Variant	Varianttyp	Genomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
~3 x 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)

* Nukleotidförändringar listas för varje variant i avsnittet Detektionsgräns förutom RET D631_L633delinsE som är kromosom 10, position 43609940, referens ACGAGCT och alternativ A.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 69 Kvalitativa resultat för riktade RNA-fusioner

Variantnivå	Fusion	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
~1 x 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-cellinje)	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 (prov 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (prov 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Variantnivå	Fusion	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	PPC (%) (n/N) (95 % KI)	PNC (%) (n/N) (95 % KI)
~2–3 x 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 cellinje)	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	Ej tillämpligt	Inte testat	100,0 (589/589) (99,4, 100,0 %)
	KIF5B-RET (prov 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (prov 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvantitativ analys

En varianskomponentanalys med begränsad maximal sannolikhet (REML) utfördes för att utvärdera den totala variationen av den underliggande kontinuerliga variabeln (VAF för små DNA-varianter och stöдавläsningar för RNA-fusioner) och uppskatta precisionskomponenter (standardavvikelse (SD), variationskoefficient (CV)) för varje variationskälla (operatörer, instrument, dagar, reagenspartier, residual och totalt). Resultaten presenteras i [Tabell 70](#) för små DNA-varianter och [Tabell 71](#) för RNA-fusioner.

Variationen i VAF ökade med medelvärdet, vilket är förväntat för en binomial proportion. Variationen i stöдавläsningar ökade med medelvärdet, vilket är förväntat med beräkningsdata. Residualkomponenten var

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

den största bidragsgivaren till total varians för både små DNA-varianter och RNA-fusioner på båda nivåerna, vilket stöder slutsatsen att detektion av varianterna av TSO Comprehensive (EU) är god för operatörer, partier, instrument och dagar.

Tabell 70 Kvantitativa SD- och CV-resultat för riktade små DNA-varianter

VAF-nivå	Variant	Varianttyp	N antal giltiga försök	Genomsnittlig VAF	SD (%CV) per operatör	SD (%CV) per instrument	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per residual	Total SD (%CV)
~1 x 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)
~3 x 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)

Tabell 71 Kvantitativa SD- och CV-resultat för riktade RNA-fusioner

Stödavläsningsnivå	Fusion	N antal giltiga försök	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	SD (%CV) per operatör	SD (%CV) per instrument	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per residual	Total SD (%CV)
~1 x 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 (cellinje)	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 (prov 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (prov 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Stödavläsningsnivå	Fusion	N antal giltiga försök	Genomsnittligt antal avläsningar som stöds	SD (%CV) per operatör	SD (%CV) per instrument	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per residual	Total SD (%CV)
2–3 x 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 (cellinje)	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 (prov 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (prov 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studie 2

Laboratoriets precision utvärderades för TMB och MSI. Fem NSCLC FFPE-DNA-prover för TMB och sju CRC FFPE-prover för MSI, inklusive både MS-stabila och hög MSI, användes för att utvärdera precision på olika nivåer över hela resultatområdet. Tre (3) operatörer körde alla prover i duplikat under tre (3) dagar, med tre (3) biblioteksprepareringar och tre (3) reagenspartier med tre NextSeq 550Dx-instrument som genererade 54 observationer per nivå.

Kvalitativ konkordans utvärderades för MSI-status. TSO Comprehensive (EU)-analysen visade 100 % konkordans för positiva bestämningar i procent och negativa bestämningar i procent för MSI-status. För TMB rapporterar TSO Comprehensive (EU)-analysen ett TMB-resultat. Kvalitativ konkordans är inte tillämpligt.

Den totala variationen av TMB- och MSI-resultat, tillsammans med bidraget per källa (instrument, operatörer, partier, dagar och residual), kvantifierades med hjälp av en varianskomponentmodell för flera resultat.

Standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten (CV) presenteras i [Tabell 72](#) för TMB och [Tabell 73](#) för MSI efter nivå. Vissa nivåer hade färre än 54 observationer på grund av ogiltiga bibliotek.

Tabell 72 Kvantitativa TMB-resultat med SD- och CV-resultat

Nivå	Genomsnittligt TMB-resultat	N antal giltiga försök	SD (%CV) per operatör	SD (%CV) per instrument	Parti-SD (%CV)	Dag-SD (%CV)	Resterande SD (%CV)	Total SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabell 73 Kvantitativa MSI-resultat med SD- och CV-resultat

MSI-status	Nivå	Genomsnittligt MSI-resultat (%)	N antal giltiga försök	Operatör SD (%CV)	SD (%CV) per instrument	SD (%CV) per parti	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per residual	Total SD (%CV)
MS-Stable (Stabil mikrosatellit)	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-High (Hög MSI)	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

Variationen i TMB-resultat tenderar att öka med medelvärdet, vilket är förväntat med teoretiska fördelningar av beräkningsdata. Variationen i MSI-resultat för nivåer nära MSI-resultat = 50 är större än variationen av MSI-resultat närmare 0, eller överensstämmer till 100 % med variationen i teoretiska fördelningar av proportionsdata. Residualkomponenten förblev den största bidragsgivaren till total varians för både MSI- och TMB-resultat, vilket stöder slutsatsen att resultaten är robusta för operatörer, partier, instrument och dagar. Både MSI och TMB är emellertid komplexa biomarkörer och analytisk prestanda kan variera från prov till prov. Det vill säga, TMB-variationen beror inte bara på TMB-värdet utan även på sammansättningen av varianter i provet, som varianttyp (SNV, Indel) och VAF-nivå (närhet till inklusionsgräns). På samma sätt beror MSI-variationen inte bara på MSI-värdet utan även på sammansättningen av platserna i provet, som antalet platser som är instabila och mängden instabilitet per plats.

C5- och C95-värden runt cutoff-värdet på 20,00 % bestämdes för MSI med hjälp av en precisionsprofil (Tabell 74).

Tabell 74 C5- och C95-intervall för MSI

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

Effekten av tumörinnehåll på TMB- och MSI-resultat utvärderades. För de flesta prover hade tumörinnehåll ≥ 30 % en försumbar inverkan på TMB-resultat över cirka 10 mutationer per megabas. TMB-resultat förblev relativt oförändrade med ökande tumörinnehåll. För prover med Hög MSI uppvisade tumörinnehållet en positiv, linjär korrelation med MSI-resultaten. För prover med Hög MSI förblev Hög MSI på genomsnittet när tumörhalten var ≥ 30 %. Endometriepröver betedde sig tydligt annorlunda än de andra vävnadstyperna och visade sig behöva en större mängd tumörinnehåll för att bestämmas som hög MSI.

Noggrannhet för tumörprofilering

Detektionen av varianter med TSO Comprehensive (EU)-analysen jämfördes med resultat från referensmetoder. Små DNA-varianter och TMB jämfördes med en NGS-metod med ett externt helexom. Genamplifieringar jämfördes mot samma NGS-metod och externa helexom eller den validerade DISH-metoden för HER2-amplifieringar. MSI utvärderades mot ett validerat MSI-PCR-test. RNA-splicevarianter jämfördes mot

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

en validerad kvantitativ PCR-metod (qPCR). ROS1- och ALK-fusioner jämfördes med validerade FISH-analyser. Alla andra fusioner jämfördes med en sammansatt metod bestående av ett validerat RNA-helexom, en NGS-analys (RNGS1), en riktad NGS-panel (RNGS2) och digital polymeraskedjereaktion (ddPCR).

Detektion av små DNA-varianter

Detektion av små DNA-varianter med TSO Comprehensive (EU)-analysen jämfördes med resultaten av helexomsekvensering (WES), som kombinerar WES med matchade tumörprover och normala prover för bestämning av små varianter – könsellsvarianter eller somatiska varianter. Jämförelsen mellan små varianter, bestående av enkelnukleotidvarianter (SNV:er), insertioner och deletioner, baserades på 124 prover från 14 olika vävnadstyper som var giltiga för både TSO Comprehensive (EU) och WES. TSO Comprehensive (EU) men inte WES-analysen kan detektera multinukleotidvarianter (MNV, 2–3 bp) som kräver fasning. TSO Comprehensive (EU) MNV:erna utvärderades som individuella SNV:er mot WES. En sammanfattning av överensstämmelse på variantnivå, inklusive positiv procentuell överensstämmelse (PPA) och negativ procentuell överensstämmelse (NPA) för alla variantbestämningar visas i [Tabell 75](#).

Tabell 75 Sammanfattning av överensstämmelse för bestämning av små varianter utvärderade efter könsellsstatus eller somatisk status

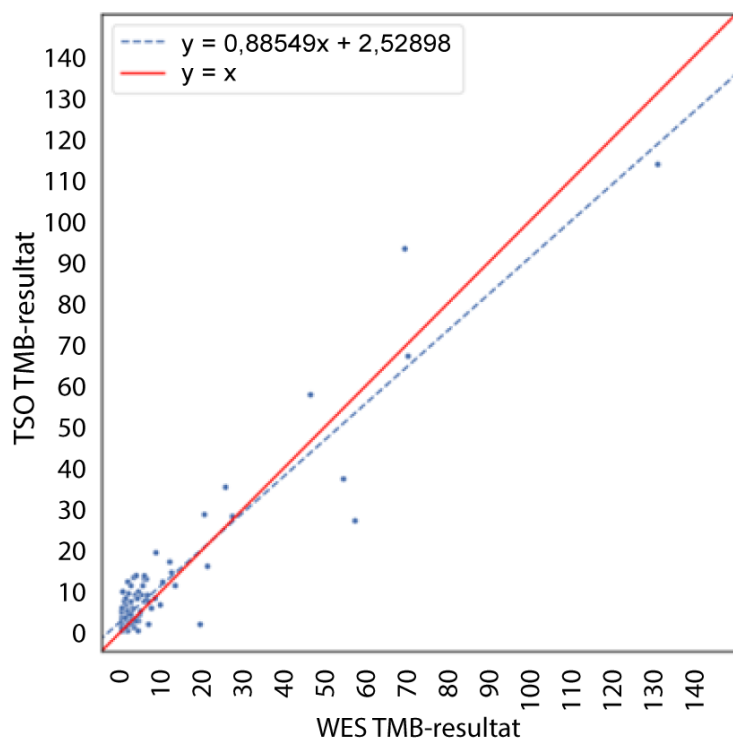
	Somatisk bestämning med WES	Besättning med WES Germline	Ingen bestämning med WES
TSO Comprehensive (EU) bestämning	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) ingen bestämning	69	61	70 000 481
Totalt	451	33 224	70 000 907
Procentuell överensstämmelse	PPA: 85 % (382/451) 95 % KI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95 % KI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95 % KI: [99,999 %, 99,999 %]

Totalt bestämde TSO Comprehensive (EU) 426 somatiska varianter som inte detekterades av WES-metoden. Tvåhundra fyra (48 %) av varianterna hade variantallfrekvenser under tröskeln för bestämning med WES-metoden. Bland de återstående potentiellt falska positiva varianterna fanns det bevis för variantbestämningen i WES-metoden med lågt stöd. Många av varianterna hade även en mycket låg nivå av WES-bevis för de matchade normala proverna. Detta resultat tyder på att WES missade varianterna i tumören på grund av kontaminering av prover med tumörvävnad och normal vävnad.

Detektion av tumörmutationell börda

TMB-överensstämmelse bestämdes genom att jämföra TMB-resultat (somatiska mutationer/megabas) mellan WES-metoden och TSO Comprehensive (EU) för 124 prover med tillgängliga data från både TSO Comprehensive (EU) och WES. Linjär regressionsanalys med WES som variabel hade en y-skärning på 2,53, en lutning på 0,89 och en Pearsons korrelationskoefficient på 0,94 ([Figur 3](#)).

Figur 3 Korrelation mellan TMB-resultat från WES och TSO Comprehensive (EU)



Detektion av genamplifiering

Detektionen av genamplifieringar med TSO Comprehensive (EU)-analysen jämfördes med resultaten av samma WES-analys med antingen matchade tumörprover och normala prover eller endast tumörprover. Totalt fanns det 420 prover varav 183 använde den ortogonala metoden för tumörprover och normala prover och 237 använde metoden för endast tumörprover. Av de 420 proverna valdes 50 prover ut för studien eftersom de var amplifieringspositiva med TSO Comprehensive (EU) eller en föregående analys. Prestanda för dessa karakteriserade prover justerades med hjälp av en genomsnittlig fusionsprevalens. Den kombinerade prestandan över karakteriserade och icke-karakteriserade prover använde ett viktat genomsnitt för omvänd varians. Proverna var från 14 vävnadstyper och innehöll amplifieringar från 55 gener. TSO Comprehensive (EU) rapporterar genamplifieringar från MET- och ERBB2-gener. Noggrannhet bedömdes däremot för alla 55 gener. En sammanfattning av bestämningarna av genamplifiering finns i [Tabell 76](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 76 Sammanfattning av överensstämmelse för genamplifieringar

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

*Konfidensintervall beräknat med bootstrap.

ERBB2 (HER2)-amplifieringar i mag- och bröstvävnader analyserades separat från andra genamplifieringar med användning av dubbel in situ hybridisering (DISH). Totalt testades 116 bröst- och magprover, varav 64 tidigare hade karakteriserats som HER2-positiva av IHC eller FISH. Ett prov misslyckades vid extraktion, fyra prover var inte giltiga i TSO Comprehensive (EU) och tre prover var inte giltiga i DISH-analysen. Av de 108 proverna hade 20 (18,5 %) resultat på gränsen (mellan 1,5 och 2,5) nära DISH-gränsvärdet på 2,0. Konkordansresultat, inklusive PPA och NPA, för alla prover, exklusive gränsfall för HER2 DISH, visas i [Tabell 77](#).

Tabell 77 Sammanfattning av konkordans mellan TSO Comprehensive och HER2 DISH, inklusive HER2-genamplifiering

HER2-genamplifiering Alla (bröst och magsäck)	HER2 DISH, amplifierad	HER2 DISH, inte amplifierad
TSO Comprehensive (EU) positiv	17 (inklusive 1 på gränsen)	13 (inklusive 1 på gränsen)
TSO Comprehensive (EU) negativ	10 (inklusive 6 på gränsen)	68 (inklusive 12 på gränsen)
Procentuell överensstämmelse inklusive gränsfall	PPA: 63 % (17/27) 95 % KI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % KI: [74 %, 90 %]
Procentuell överensstämmelse exklusive gränsfall	PPA: 80 % (16/20) 95 % KI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % KI: [72 %, 90 %]

Detektion av mikrosatellitinstabilitet

Upptäckten av mikrosatellitinstabilitet med TSO Comprehensive (EU)-analysen jämfördes med resultaten från ett validerat MSI-PCR-test som använde matchade tumörprover och normala prover för testning. Totalt jämfördes 195 prover, som uppfyllde kravet på tumörinnehåll på ≥ 30 % (för stabil mikrosatellitstatus) och representerar 14 vävnadstyper. MSI-PCR utvärderar 5 platser och har 3 utfall - MSI-stabil (inga instabila platser), låg MSI (MSI-Low) (en instabil plats) och hög MSI (MSI-High) (två eller flera instabila platser). TSO Comprehensive (EU) utvärderar upp till 130 mikrosatellitplatser och klassificerar endast prover som MS-stabila eller hög MSI (≥ 20 % instabila platser). Låg MSI grupperades med MS-stabila resultat för MSI-PCR. Konkordansanalysen visas i [Tabell 78](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 78 Sammanfattning av konkordansanalys mellan TSO Comprehensive (EU) och MSI-PCR för DNA-mikrosatellitinstabilitet

MSI-status	PCR , hög MSI	PCR , låg MSI	PCR MSI-stabil
TSO Comprehensive (EU) Instabil (MSI-hög)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabil (MS-Stable (Stabil mikrosatellit))	3	0	150
Totalt	44	2	150
Procentuell överensstämmelse	PPA: 93 % (41/44) 95 % KI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % KI: [95 %, > 99 %]	

Detektion av RNA-splicevariant

Noggrannhet för detektion av splicevarianter beräknades genom att jämföra TSO Comprehensive (EU)-resultat med qPCR-analyser för EGFRvIII och MET exon 14 hoppar över, inklusive ett känt positivt RNA-resultat för var och en av splicevarianterna. Konkordansanalys utfördes på totalt 230 unika FFPE RNA-prover från 14 vävnadstyper med tillgängliga data från både TSO Comprehensive (EU) och referensmetoden. Alla prover har testats för MET-exon 14 hoppar över, medan EGFRvIII har testats endast i respektive hjärnvävnad. Tre prover, som kallades positiva för MET Exon 14 hoppar över, av qPCR men inte av TSO Comprehensive (EU) hade genomsnittlig Ct > 37 och låg under TSO Comprehensive (EU)-LoD-nivån. [Tabell 79](#) sammanfattar resultaten av konkordansstudien.

Tabell 79 Sammanfattning av konkordansanalys mellan TSO Comprehensive (EU) och qPCR-analys för RNA-splicevarianter

RNA-splicevarianter	qPCR-positiva	qPCR-negativa
TSO Comprehensive (EU) positiv (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) negativ (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) positiv (MET exon 14 hoppades över)	1	0
TSO Comprehensive (EU) negativ (MET exon 14 hoppades över)	3	217
Totalt	7	230
Procentuell överensstämmelse	PPA: 57 % (4/7) 95 % KI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % KI: [98 %, 100 %]

Detektion av RNA-fusion

Jämförelse med en sammansatt metod

TSO Comprehensive (EU)-fusioner jämfördes med en sammansatt metod bestående av en RNA-helexomsekvensering med hjälp av en NGS-panel (RNGS1), en riktad NGS-fusionspanel (RNGS2) och digital polymeraskedjereaktion (ddPCR).

RNGS1-metoden överlappar alla gener för vilka TSO Comprehensive (EU) kan detektera fusioner. Detektionsgränsen för RNGS1-metoden var däremot 4x–8x för TSO Comprehensive (EU) baserat på antalet stödda avläsningar som observerats i de överlappande fusionsbestämningarna. Därför användes en sammansatt metod med ytterligare två metoder med större känslighet men mindre bredd för fusioner i samband med WES (RNGS1)-metoden.

Totalt 255 unika RNA-prover representerande 14 vävnadstyper och godkända TSO Comprehensive (EU)-mått testades med RNGS1. Två prover fick ogiltiga resultat vid kvalitetskontrollen av RNGS1-proverna och exkluderades från ytterligare analys. Av de 82 fusioner som bestämdes av TSO Comprehensive (EU) uteslöts fyra från utvärderingen på grund av kvalitetskontrollfel för RNGS1-prover, och ytterligare sju fusioner kunde inte bestämmas på grund av frånvaron av målen i RNGS1-panelen. Av de återstående 71 fusioner som bestämts av TSO Comprehensive (EU) bekräftades nio fusioner av RNGS1. RNGS1 bestämde fyra fusioner som inte bestämdes av TSO Comprehensive (EU).

Bland de 62 fusionerna som var TSO Comprehensive (EU)-positiva och inte detekterades av RNGS1 överlappade 13 med och bekräftades av RNGS2. En fusion bestämdes av RNGS2 men bestämdes inte av TSO Comprehensive (EU).

ddPCR användes sedan för fusioner som bestämdes av TSO Comprehensive (EU), inte bestämdes eller inte kunde bestämmas av RNGS1, och inte kunde utvärderas av RNGS2 (49). Dessutom användes ddPCR för omvärdering av två av de fyra falskt negativa fusionerna för TSO Comprehensive (EU) med RNGS1, och två av nio överensstämmande fusioner för TSO Comprehensive (EU) och RNGS1. Fem fusionsnegativa prover inkluderades med testning av varje positivt fusionsprov för att säkerställa specificitet. 18 fusioner testades inte med ddPCR på grund av oförmåga att designa primrar/prober, flera genpartners för fusionen eller otillräckligt kvarvarande FFPE-material. För ddPCR designades primrar och prober mot de observerade brytpunkterna i TSO Comprehensive (EU)-analysen.

Totalt upptäcktes 52 fusioner av ddPCR, 41 av dessa bestämdes av TSO Comprehensive (EU) men bestämdes inte eller kunde inte bestämmas av RNGS1. Nio fusioner bestämdes av ddPCR men var negativa i TSO Comprehensive (EU) eller RNGS1. Två ddPCR-positiva fusioner bekräftade de två överensstämmande fusionerna för TSO Comprehensive (EU) och RNGS1. Ingen fusion upptäcktes med ddPCR för de två omvärderade falskt negativa TSO Comprehensive (EU) med RNGS1. De räknades däremot som falskt negativa baserat på RNGS1-jämförelsen.

Av de 255 proverna valdes 35 prover ut för studien eftersom de var fusionspositiva med TSO Comprehensive (EU) eller en föregående analys. Prestanda för dessa karakteriserade prover justerades med hjälp av en

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

genomsnittlig fusionsprevalens. Den kombinerade prestandan över karakteriserade och icke-karakteriserade prover använde ett viktat genomsnitt för omvänd varians. De sammansatta konkordansresultat för fusioner visas i [Tabell 80](#).

De 66 fusioner (54 unika fusioner), som överensstämde med den sammansatta metoden, representerade 43 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelen. Däremot är fusioner endast kvalificerade för rapportering från de 23 gener som anges i [Tabell 80](#).

Tabell 80 Sammanfattning av överensstämmelse för RNA-fusioner

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

*Konfidensintervall beräknat med bootstrap.

Jämförelse med FISH-metoden för ROS1- och ALK-fusioner

Tjugofem NSCLC-prover testades med FISH för både ROS1- och ALK-fusioner och ytterligare fem NSCLC-prover testades för ROS1-fusioner. Åtta prover misslyckades med FISH för ROS1 på grund av otillräcklig vävnad. Två ROS1 och en ALK-fusion detekterades av både TSO Comprehensive (EU) och FISH. Inga avvikande resultat observerades. [Tabell 81](#) sammanfattar konkordansresultaten för TSO Comprehensive (EU) och FISH-metoden för ROS1- och ALK-fusioner.

Tabell 81 Sammanfattning av konkordansresultat för TSO Comprehensive (EU) och FISH-metoden för ROS1- och ALK-fusioner

ALK+ROS1	Positiva för FISH	Negativa för FISH
TSO Comprehensive (EU) positiv	3	0
TSO Comprehensive (EU) negativ	0	44
Totalt	3	44
Procentuell överensstämmelse	PPA: 100 % (3/3) 95 % KI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % KI: [92 %, 100 %]

Provgiltighet

Provernans giltighet (första försöket) mättes för 181 unika RNA-prover och 272 unika DNA-prover från FFPE-block som var ≤ 5 år gamla. Proverna valdes utifrån vävnadstyp och tillgängligt material. Analysens giltighet var okänd. Bibliotekets kvalitetskontrollmått måste godkännas för att varianttypen ska anses vara giltig. Provernans validitet utvärderades separat för var och en av varianttyperna (små DNA-varianter/TMB, MSI, genamplifieringar, fusioner/splicevarianter) och resultaten visas i [Tabell 82](#). En ytterligare minskning av MSI-giltigheten på 1 % för FFPE-block ≤ 2 år på grund av reagensleverans förutspås.

Tabell 82 Provgiltighet

Varianttyp	Provgiltighet
Fusioner/splice varianter (RNA)	76 %
Små DNA-varianter/TMB	75 %
MSI	72 %
Gen amplifiering	94 %

Sammanfattning av analytisk validering för anspråk avseende profilering av tumör

Baserat på data för detektionsgräns, precision, reproducerbarhet och noggrannhetsdata är TSO Comprehensive (EU) analytiskt validerad för följande:

- Små DNA-varianter – SNV:er, MNV:er, insertioner och deletioner.
- TMB
- MSI
- Genamplifieringarna MET och ERBB2 (HER2) (se [Tabell 2](#)).
- 23 gener för vilka fusioner kan detekteras (se [Tabell 2](#)).
- Splicevarianterna EGFR och MET (se [Tabell 2](#)).

NTRK Kliniska prestanda

För att validera TSO Comprehensive (EU)-analysen som en produkt för behandlingsvägledande diagnostik (CDx) för val av patienter för behandling med VITRAKVI (larotreklinib) testades prover från patienter som registrerats i de kliniska studierna av larotreklinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687 – hänvisas gemensamt till som larotreklinib-studieproverna) med den 15 juli 2019 som slutdatum för datainsamling, kompletterad med kommersiellt framställda FFPE-vävnadsprover, för att stödja en noggrannhetsstudie och en jämförande klinisk studie med TSO Comprehensive (EU)-analysen.

NCT02122913 var en öppen multicenterstudie i fas 1 som studerade dosökning hos vuxna patienter med avancerade solida tumörer (alla tumörer) som valts bort för NTRK-fusionspositiv cancer. Efter dosökningsdelen av studien inleddes en dosutvidgning för patienter med dokumenterad NTRK-fusionspositiv cancer samt för patienter som prövaren ansåg kunde dra nytta av en mycket selektiv TRK-hämmare. NAVIGATE NCT02576431 är en pågående, öppen multicenter- och korgstudie i fas 2 för patienter som är 12 år och äldre samt har återkommande avancerade solida tumörer med en dokumenterad NTRK-fusion som bedömts av ett externt laboratorium. SCOUT NCT02637687 är en pågående, öppen multicenterstudie i fas 1/2 för pediatrika patienter från 0 år till 21 år med avancerade solida eller primära tumörer i centrala nervsystemet (CNS).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Av de NTRK-fusionspositiva patienter som inkluderades i studien med TSO Comprehensive (EU)-analysen bildade 164 larotrektrinib-setet med utökad primär effekt (ePAS4).

Noggrannhetsstudie för detektion av NTRK1-, NTRK2- och NTRK3-fusioner

Noggrannheten hos TSO Comprehensive (EU)-analysen för att detektera NTRK-fusioner (NTRK1, NTRK2 eller NTRK3) hos patienter med solida tumörer visades genom att bedöma överensstämmelsen mellan NTRK-fusionsresultaten mellan TSO Comprehensive (EU)-analysen och en validerad ortogonal metod baserad på nästa generations sekvensering (NGS).

En retrospektiv observationsstudie genomfördes. Larotrektrinib-studieprover och kompletterande prover testades med TSO Comprehensive (EU)-analysen på en extern plats och med en ortogonal metod vid ett studielaboratorium. Noggrannheten hos TSO Comprehensive (EU)-analysens NTRK-fusionsbestämningar uppskattades i förhållande till den ortogonala metoden – positiv procentuell överensstämmelse (PPA), negativ procentuell överensstämmelse (NPA) och de tvåsidiga 95 % konfidensintervallen (KI) beräknades.

516 prover testades med TSO Comprehensive (EU)-analysen och/eller den ortogonala metoden. Av dessa testades 499 med båda metoderna. Sjutton av de 516 proverna testades inte med någon av analyserna på grund av misslyckad extraktion, okänd anledning (för den ortogonala metoden) eller protokollavvikelse. Av de 499 proverna som testades med båda metoderna var 170 (34,1 %) larotrektrinib-studieprover och 329 (65,9 %) var kompletterande prover.

En korstabell över resultaten för de 499 proverna visas i [Tabell 83](#). Av de 499 proverna hade 85 prover ogiltiga TSO Comprehensive (EU)-analysresultat; av dessa 85 hade 53 också ogiltiga ortogonala metodresultat. Ytterligare sju prover hade ogiltiga resultat för den ortogonala metoden. Således hade 407 av de 499 proverna giltiga resultat med båda metoderna.

Tabell 83 NTRK noggrannhetsstudie: Korstabulering av resultat från TSO Comprehensive (EU) kontra resultat från den ortogonala metoden för detektering av NTRK-fusioner

TSO Comprehensive (EU) analysresultat	Resultat från den ortogonala metoden			
	Positiva för NTRK -fusion	Negativa för NTRK -fusion	Ogiltiga	Totalt
Positiva för NTRK-fusion	114	16	1	131
Negativa för NTRK-fusion	4	273	6	283
Ogiltiga*	4	28	53	85
Totalt	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU)Ogiltiga resultat från -analysen kommer från prov- och körningsnivå.

Överensstämmelseanalyserna, exklusive och inklusive ogiltiga TSO Comprehensive (EU)-analysresultat, visas i [Tabell 84](#). Med undantag för ogiltiga TSO Comprehensive (EU)-analysresultat var PPA 96,6 % (114/118; 95 % KI: 91,5 %-99,1 %) och NPA var 94,5 % (273/289; 95 % KI: 91,2 %-96,8 %).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 84 NTRK noggrannhetsstudie: PPA och NPA för TSO Comprehensive (EU)-analysen jämfört med resultat från den ortogonala metoden för detektion av NTRK-fusioner

Mått på överensstämmelse	Exklusive ogiltiga TSO Comprehensive (EU)-analysresultat		Inklusive ogiltiga TSO Comprehensive (EU)-analysresultat	
	Överensstämmelse, % (n/N)	95 % CI*	Överensstämmelse, % (n/N)	95 % CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

* 95 % KI baserat på (exakt) Clopper-Pearson-metoden.

Jämförande klinisk studie för detektion av NTRK1-, NTRK2- och NTRK3-fusioner

Den kliniska giltigheten hos TSO Comprehensive (EU)-analysen för att detektera NTRK1-, NTRK2- eller NTRK3-fusioner hos patienter med solida tumörer som kan dra nytta av behandling med larotreklinib visades i en jämförande klinisk studie. Studien utfördes för att bedöma den kliniska effektiviteten av TSO Comprehensive (EU)-analysen för att identifiera patienter som var positiva för NTRK1-, NTRK2- eller NTRK3-fusioner för behandling med larotreklinib, samt för att bedöma överensstämmelsen mellan TSO Comprehensive (EU)-analysen och lokala testmetoder (LT-metoder) (som används för att fastställa NTRK-fusionsstatus för de kliniska studierna med larotreklinib).

LT-metoder inkluderade NGS, fluorescent in-situ-hybridisering (FISH), polymeraskedjereaktion (PCR) och NanoString-analyser. NTRK-fusioner (ETV6 NTRK3) antogs för patienter med infantilt fibrosarkom som hade en dokumenterad ETV6-translokation som identifierats av FISH. Majoriteten av de 235 larotreklinib-studiepatienterna med en känd NTRK-fusionsstatus hade testats med NGS-metoder.

Vid slutdatumet för datainsamling, den 15 juli 2019, hade 279 patienter registrerats. Av de 279 patienterna var 208 positiva för NTRK-fusion. Av de 208 positiva patienterna bildade 164 larotreklinib ePAS4.

Det primära effektmåttet för effektivitetsanalysen av larotreklinib var total svarsfrekvens (ORR) enligt bedömning av en oberoende granskningskommitté (IRC) i en sammanslagen datauppsättning från de tre kliniska studierna. ORR bedömdes baserat på andelen patienter med bästa totala svar av bekräftat fullständigt svar eller bekräftat partiellt svar baserat på RECIST-riktlinjer, version 1.1. ORR i larotreklinib ePAS4 var 72,6 % (95 % KI [65,1 %, 79,2 %]) och inkluderade patienter med 16 olika tumörtyper.

Redovisning av prover

Provuppsättningen inkluderade ett brett spektrum av tumörtyper och prover från pediatrika och vuxna patienter.

Den 15 juli 2019 hade 279 patienter registrerats i larotreklinib-studierna. Av dessa hade 235 patienter en känd NTRK-fusionsstatus som bestämts med en LT-metod: 208 var positiva och 27 var negativa. För 44 patienter var NTRK-fusionsstatusen okänd, eftersom testning inte krävdes för att patienten skulle vara lämplig i dosökningsfaserna i studierna NCT02122913 och SCOUT NCT02637687. För den jämförande kliniska studien med TSO Comprehensive (EU)-analysen var prover från larotreklinib-studiepatienter med känd

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

NTRK-fusionsstatus (208 positiva patienter och 27 negativa patienter) som registrerats fram till den 15 juli 2019 och de kompletterande proverna som fastställdes vara NTRK-fusionsnegativa med representativa LT-metoder kvalificerade att användas.

Av de 208 larotrektrinib-studieprover som var positiva hade 154 ett prov tillgängligt för testning med TSO Comprehensive (EU)-analysen. Av dessa hade 138 giltiga resultat. Femton prover var ogiltiga på grund av misslyckade provsekvenseringskvalitetsmått och ett prov testades inte på grund av en protokollavvikelse. Av de 27 larotrektrinib-studieprover som var negativa hade 24 ett prov tillgängligt för testning. Av dessa hade 22 giltiga TSO Comprehensive (EU)-analysresultat. Två prover var ogiltiga på grund av misslyckade provsekvenseringskvalitetsmått.

Kompletterande prover screenades med en av två representativa LT-metoder. Fler än 350 prover samlades in och undersöktes med avseende på tumörinnehåll. Av de kompletterande proverna som uppfyllde provkraven extraherades 266 framgångsrikt och bekräftades vara NTRK-fusionsnegativa med en representativ LT-metod. Av dessa var 260 tillgängliga för testning med TSO Comprehensive (EU)-analysen, varav 222 hade giltiga resultat. Det fanns 38 prover som var ogiltiga på grund av att provsekvenseringsmåttens misslyckades (n = 25) eller körningssekvenseringen misslyckades (n = 13). Den totala NTRK-fusionsnegativa uppsättningen bestod av 222 kompletterande prover och 22 larotrektrinib-studieprover.

Konkordansresultat

Totalt testades 437 prover av TSO Comprehensive (EU). Bland de 208 NTRK-fusionspositiva patienterna fanns det 153 som hade tillgängliga prover och testades av TSO Comprehensive (EU), vilket gav 138 giltiga resultat och 15 ogiltiga resultat.

Överensstämmelsen mellan TSO Comprehensive (EU)-resultat i förhållande till resultat från LT-metoderna, med och utan ogiltiga TSO Comprehensive (EU)-resultat, visas i [Tabell 85](#).

Tabell 85 NTRK klinisk överbrygningsstudie: Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive (EU)-analysen och LT-metoder för detektering av NTRK-fusioner

Mått på överensstämmelse	Exklusive TSO Comprehensive (EU) ogiltiga analysresultat		Inklusive TSO Comprehensive (EU) ogiltiga analysresultat	
	% överensstämmelse (n/N)	95 % KI*	% överensstämmelse (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

* De tvåsidiga, 95-procentiga KI-värdena beräknades med (exakt) Clopper-Pearson-metoden.

En känslighetsanalys mot saknade TSO Comprehensive (EU)-analysresultat visade på överensstämmelseanalysens robusthet. Saknade TSO Comprehensive (EU)-analysresultat för patienterna som funnits positiva för NTRK-fusioner med LT (n = 70) imputerades med hjälp av en logistisk regressionsmodell. Uppskattningar av överensstämmelsen, inklusive imputerade värden, visas i [Tabell 86](#).

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Tabell 86 NTRK klinisk överbrygningsstudie: Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive (EU)-analysen och LT-metoder för detektion av NTRK-fusioner inklusive imputerade värden för patienter som funnits positiva med LT och saknar TSO Comprehensive (EU)-analysresultat

Mått på överensstämmelse	% överensstämmelse	95 % KI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Saknade TSO Comprehensive- (EU) analysresultat för patienter som befunnits vara fusionsnegativa med LT imputerades inte.

* Det tvåsidiga 95 % KI beräknades baserat på bootstrapping-metoden med multipel imputering. Bootstrapping-metoden med multipel imputering är ett bootstrap-steg som är kapslat i den multipla imputeringen (Schomaker and Heumann 2018).

Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive (EU)-analysen och LT per metodtyp (t.ex. RNA NGS, FISH) visas i [Tabell 87](#).

Tabell 87 NTRK klinisk överbrygningsstudie: Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive (EU)-analysen och LT-metoder för detektion av NTRK-fusioner med LT-metodtyp

LT-metodtyp	Mått på överensstämmelse	% överensstämmelse (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	Ej beräknat (1/1)	Ej beräknat
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Ej beräknat (0/0)	Ej beräknat
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Ej beräknat: för undergrupper med < 5 prover beräknades inte statistik för överensstämmelse.

¹ Det tvåsidiga 95 % KI beräknades med (exakt) Clopper-Pearson-metoden.

² Inkluderar NGS-metoder som endast använder RNA samt både DNA och RNA.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight Oncology Comprehensive (EU))

Av de 437 proverna som testades med TSO Comprehensive (EU)-analysen hade 24 avvikande resultat jämfört med LT-metoderna: 15 var positiva med LT-metoderna och negativa med TSO Comprehensive (EU)-analysen, och 9 var negativa med LT-metoderna och positiva med TSO Comprehensive (EU)-analysen. Av de 24 proverna med ej överensstämmande resultat testades åtta med en DNA NGS LT-metod, 14 med en RNA NGS LT-metod och två med FISH.

En validerad oberoende NGS-metod bekräftade TSO Comprehensive (EU)-analysens resultat i 14 av de 24 proverna med ej överensstämmande resultat. För de återstående tio proverna var TSO Comprehensive (EU)-analysresultaten ej överensstämmande med både LT och den oberoende NGS-metoden.

Kliniska effektivitetsresultat

Inom ePAS4-kohorten var effekten av larotreklinib i den TSO Comprehensive (EU)-positiva och LT-positiva populationen (97 patienter, ORR = 78,4 %, 95 % KI [68,8 %, 86,1 %]) liknande effekten av larotreklinib i den totala ePAS4-populationen (164 patienter, ORR = 72,6 %, 95 % KI [65,1 %, 79,2 %]) ([Tabell 88](#)). Av de 97 TSO Comprehensive (EU)-positiva patienterna i ePAS4 hade 28 (28,9 %) patienter uppnått ett fullständigt svar/stringent fullständigt svar och 48 (49,5 %) patienter hade uppnått ett partiellt svar.

Av de 13 TSO Comprehensive (EU)-negativa och LT-positiva populationerna visade en (7,7 %) fullständigt svar och två (15,4 %) partiellt svar med larotreklinib-behandling.

Tabell 88 NTRK klinisk överbryggningsstudie: ORR för LT-positiva patienter per LT och TSO Comprehensive (EU) resultat i ePAS4

		Positiva för fusion med LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Positiva och LT-positiva N=97	TSO Comprehensive (EU) Negativa och LT-positiva N=13
Bästa övergripande svar, n (%)	Fullständigt svar	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Stringent fullständigt svar	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Partiellt svar	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabil sjukdom	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progressiv sjukdom	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Ej utvärderingsbar	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Total svarsfrekvens	Antal patienter, n	164	97	13
	Antal patienter med 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)

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Förkortningar: CR = Complete Response (fullständigt svar), PR = Partial Response (partiellt svar), sCR = Surgical Complete Response (stringent fullständigt svar).

* Det tvåsidiga 95 % konfidensintervallet beräknades med (exakt) Clopper-Pearson-metoden.

54 patienter saknar TSO Comprehensive- (EU) analysresultat.

Data från den här studien stöder säkerheten och effektiviteten av TSO Comprehensive (EU)-analysen när den används för att identifiera patienter med solida tumörer med NTRK-fusioner som kan vara lämpliga för behandling med larotreklinib.

Referenser

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Använd 3 oktober 2016.
2. Europeiska sällskapet för medicinsk onkologi. www.esmo.org. Använd 3 oktober 2016.

Revisionshistorik

Ändring	Datum	Beskrivning av ändring
Dokumentnr 200007789 v08	Maj 2025	Tog bort hänvisning till programvaruversioner och artikelnummer. Uppdaterade begränsningar av proceduren: - Information om nekrotisk vävnad. - Information om MSI-tumörinnehåll. Uppdaterat: - NTC-fotnot ska tillämpas på både min- och maxbibliotek. - Utrustning och material anger plattans centrifugspecifikationer och pipettsteg. - SPB-överskottsberäkning från 1,05x till 1,15x. - Terminologi för MET-exon 14 del till MET-exon 14 hoppades över. Tillagt: - Anmärkning för SMB i Fånga mål ett och två. - Förbered för sekvenseringsintroduktion. - Ytterligare information om ultrasonikatoren. Lade till förtydliganden och uppdaterade resultat för Prestandaegenskaper: - Interfererande substanser. - Noggrannhet för tumörprofilering och provets giltighet. - Detekktionsgränsstudie 1 och 2. - Precisionsstudie inom laboratoriet 1. - Reproducerbarhetsstudie 2. - Biblioteksstabilitet och information om bibliotekslagring. - Gräns för blankprov. Uppdaterade språk och grammatik.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Ändring	Datum	Beskrivning av ändring
Dokumentnr 200007789 v07	Januari 2024	- Information har lagts till i Procedures begränsningar: - Provkrav för nekrotisk vävnad och tumörinnehåll för hög MSI och somatiska drivande mutationer. - Potentiell interferens från hemoglobin. - Detektionsgränser i RET-genen och fusionsbestämning utanför annoterade gengränser. - Gendelektioner rapporteras inte. - Uppdaterad för användning med TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager programvaruversion 2.3.7. - Information har lagts till för den utrustning och det material som krävs men inte medföljer, inklusive två ytterligare konfigurationer för ultrasonikatorer. - Uppdaterad provinformation: - Innehåll i nekrotisk vävnad. - Effekter av proteinas K och hemoglobin. - Förvaring av FFPE fäst på objektglas och renad nukleinsyra. - Lade till information för att förbättra reagenshantering, arbetsflöde och felsökning av kvalitetskontroll av körning. - Lade till sammanhang och tydlighet i Prestandaegenskaper: - Korskontaminering - Utvärdering av extraktionssatser för nukleinsyra - Interfererande substanser - Stabilitet hos nukleinsyra och FFPE fäst på objektglas - NTRK kliniska prestanda - Uppdaterade språk och grammatik
Dokumentnr 200007789 v06	Februari 2023	- Ytterligare påståenden i avsnittet Begränsningar - Språkuppdateringar för konvention, grammatik och tydlighet - Rättning av tabellerna 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Förklaring om förekomst av utfällningar i FSM-reagens - Uppdaterade specifikationer för termocykler och tråg i listan över utrustning och material
Dokumentnr 200007789 v05	September 2022	Reproducerbarhetstabellerna för studie 2 har uppdaterats
Dokumentnr 200007789 v04	Juni 2022	- Lade till TSO Comprehensive analysis module v2.3.5 PNs - Tog bort TSO Comprehensive analysis module v2.3.3 PNs - Uppdaterade terminologi i avsnittet Gräns för blankprov

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Ändring	Datum	Beskrivning av ändring
Dokumentnr 200007789 v03	April 2022	• Prestandaegenskaper relaterad till NTRK-fusioner har lagts till • Märkningen ENDAST FÖR EXPORT har lagts till • Den avsedda användningen har uppdaterats för att lägga till ett CDx-påstående för NTRK1-3 • Informationen om produktkomponenter har utökats för att inkludera programvarukomponenters artikelnummer
Dokumentnr 200007789 v02	Februari 2022	• Tabellreferensfel har korrigerats • Begränsning relaterad till könscellsvarianter och somatiska varianter har lagts till • Formuleringar om detektion av genamplifiering har förtydligats
Dokumentnr 200007789 v01_swe	December 2021	• Procedurens begränsningar har uppdaterats • Specifikationerna för magnetstativet och termocyklern har förtydligats i utrustnings- och materiallistorna
Dokumentnr 200007789 v00	November 2021	Första versionen.

TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (EU) (Bipacksedel till TruSight **illumina**[®] Oncology Comprehensive (EU))

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs här. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överläter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas noggrant och uttryckligen av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivningen här. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2025 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformation



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Märkning av produkter

För en fullständig referens till symboler som visas på produktens förpackning och märkning, se symbolnyckeln på support.illumina.com på fliken *Documentation* (Dokumentation) för din sats.