

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Bijsluiter

VOOR GEBRUIK BIJ IN-VITRODIAGNOSTIEK. UITSLUITEND BEDOELD VOOR DE EXPORT.

Beoogd gebruik

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) is een *in-vitro* diagnostische test die gebruik maakt van gerichte next-generation sequencing om varianten in 517 genen te detecteren met behulp van nucleïnezuren geëxtraheerd uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) tumorweefselmonsters van kankerpatiënten met solide kwaadaardige neoplasma's met behulp van het Illumina®NextSeq™ 550Dx-instrument. De test kan worden gebruikt om enkelvoudige nucleotide-varianten, multinucleotide varianten, inserties, deleties en genamplificaties te detecteren in DNA, en genfusies en splicingvarianten in RNA. De test rapporteert ook een score voor tumormutatielast ('Tumor Mutational Burden', TMB) en een status voor microsatellietinstabiliteitstatus (MSI).

De test is bedoeld als een begeleidende diagnostiek voor het identificeren van kankerpatiënten voor behandeling met de gerichte therapie die wordt genoemd in [Tabel 1](#), in overeenstemming met het goedgekeurde label voor het therapeutische product. Bovendien is de test bedoeld voor het bieden van informatie over tumorprofilering die in overeenstemming met professionele richtlijnen door gekwalificeerde medische professionals kan worden gebruikt, en de test is niet beslissend of voorschrijvend voor het gelabelde gebruik van enig specifiek therapeutisch product.

Tabel 1 Indicatie begeleidende diagnostiek

Tumortype	Biomarkers	Gerichte therapie
Solide tumoren	NTRK1-, NTRK2- en NTRK3-genfusies	VITRAKVI® (larotrectinib)

Samenvatting en uitleg van de assay

Klinische beschrijving

Kanker is wereldwijd een belangrijke doodsoorzaak en kan in elk weefsel ontstaan^{1,2}. Analyse van de genetische basis van kanker is belangrijk voor het identificeren van patiënten die baat kunnen hebben bij gerichte therapieën en voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmethoden. Er zijn talloze genen betrokken bij het ontstaan of de progressie van kanker en veel kankersoorten dragen een verscheidenheid aan varianten die van invloed zijn op deze genen en hun functies. Deze varianten zijn onder andere genmutaties zoals single-nucleotide-varianten (SNV's), multi-nucleotide-varianten (MNV's), inserties of deleties, genamplificaties, genfusies en splicevarianten. Een ander gevolg van mutaties in kankergenen is de presentatie

van neoantigenen die kankerspecifieke immuunreacties uitlokken. De mutatiestoestand van een kanker kan worden weergegeven door TMB en MSI, dit zijn genomische handtekeningen die in verband worden gebracht met genomische instabiliteit en neoantigenen bij kanker.

TruSight Oncology Comprehensive is een kwalitatieve next-generation sequencing (NGS)-test voor uitgebreid genomisch profileren (CGP, comprehensive genomic profiling) die een brede analyse maakt van genomische varianten in een groot panel van kankergerelateerde genen die staan vermeld in [Tabel 2](#). Het assay detecteert kleine varianten in 517 genen, plus genamplificaties, fusies en splicevarianten zoals aangegeven in [Tabel 2](#). Het assay biedt dekking van de coderende sequentie voor alle genen behalve TERT, waarbij alleen het promotergebied wordt gedekt, en beoordeelt de TMB-score en de MSI-status. Deze testdoelen bevatten inhoud die wordt aangehaald door professionele organisaties en andere belangrijke Amerikaanse richtlijnen. Publicaties van onafhankelijke consortia en farmaceutisch onderzoek in een laat stadium hebben ook invloed op het ontwerp van de TSO Comprehensive-assay.

Raadpleeg de *TruSight Oncology Comprehensive Block List (document # 200009524)* die beschikbaar is op de Illumina [ondersteuningssite](#) voor een lijst met regio's die zijn uitgesloten van variantbepaling.

In [Tabel 2](#) worden de volgende categorieën varianttypes geïdentificeerd: Kleine DNA-variant (S, small), genamplificatie (A), fusie (F), en splicevariant (Sp). Kleine DNA-varianten omvatten SNV's, MNV's en inserties en deleties.

Tabel 2 TSO Comprehensive (EU) assay-genenpaneel

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S

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

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

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
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

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
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	ERRF1	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
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFH3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.

Principes van de procedure

Het TSO Comprehensive (EU)-assay is een verspreide test die handmatig wordt uitgevoerd met geëxtraheerd nucleïnezuur als inputmateriaal. DNA en/of RNA dat is geëxtraheerd uit met formaline gefixeerd paraffine ingebed weefsel (FFPE) wordt gebruikt om bibliotheken voor te bereiden, die vervolgens worden verrijkt voor kanker-gerelateerde genen en gesequencet op de NextSeq 550Dx-instrument.

Het TSO Comprehensive (EU)-assay omvat de volgende processen.

- **Preparatie en verrijking van bibliotheek**—Voor RNA wordt in totaal 40 ng geconverteerd tot dubbelstrengs complementair DNA (cDNA). Voor genomisch DNA (gDNA) wordt 40 ng gDNA in kleine fragmenten gesheerd. Universele adapters voor sequencing worden geligeerd op de cDNA- en gDNA-fragmenten. In elke bibliotheek worden P5- en P7-adaptersequenties verwerkt om tijdens sequencing het opnemen van bibliotheekfragmenten op het oppervlak van de stroomcel mogelijk te maken. De adapters bevatten i5- en i7-indexsequenties om elk individueel monster en, in het geval van bibliotheken van gDNA-monsters, individuele moleculen te identificeren met behulp van unieke moleculaire identificatiemiddelen (UMI's). De bibliotheken worden vervolgens verrijkt voor de specifieke genen van belang met een op opnemen gebaseerde methode. Gebiotinyleerde probesequenties die gengebieden van belang omvatten waarop de assay is gericht, worden gehybridiseerd naar de bibliotheken. De probes en gehybridiseerde doelbibliotheken worden geïsoleerd van niet-doelbibliotheken door middel van opname door magnetische deeltjes met streptavidine. De verrijkte doelbibliotheken worden gewassen en geamplificeerd. De hoeveelheid van elke verrijkte bibliotheek wordt vervolgens genormaliseerd met een methode op basis van parels om gelijke representatie in de gepoolde bibliotheken voor sequencing te garanderen.
- **Sequencing en primaire analyse**—Genormaliseerde, verrijkte bibliotheken worden gepoold en geclusterd op een stroomcel en vervolgens op de NextSeq 550Dx gesequencet aan de hand van sequencing by synthesis (SBS)-chemie. SBS-chemie maakt gebruik van een omkeerbare terminatormethode voor het detecteren van enkelvoudige, met fluorescentie gelabelde deoxynucleotide-trifosfaat (dNTP)-basen, terwijl ze in groeiende DNA-strengen worden opgenomen. Tijdens elke sequencingcyclus wordt een enkele dNTP toegevoegd aan de nucleïnezuurketen. Het dNTP-label dient als een terminator voor polymerisatie. Na elke opname van dNTP wordt de fluorescente kleurstof met beeldvorming weergegeven om de base te identificeren en vervolgens gespleten om opname van de volgende nucleotide mogelijk te maken. Vier omkeerbare terminator-gebonden dNTP's (A, G, T en C) zijn aanwezig als enkele, afzonderlijke moleculen. Als gevolg daarvan minimaliseert natuurlijke concurrentie de opnamebias. Tijdens de primaire analyse worden basebepalingen direct gedaan op basis van signaalintensiteitsmetingen tijdens elke sequencingcyclus, resulterend in base--voor--base sequencing. Er wordt een kwaliteitsscore toegewezen aan elke basebepaling.
- **Secundaire analyse**—De Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule bevindt zich op het NextSeq 550Dx-instrument als onderdeel van de Local Run Manager-software om het instellen van TSO Comprehensive (EU)-run te vergemakkelijken en secundaire analyse van sequencingresultaten uit te voeren. Secundaire analyse omvat validatie van runverwerking en kwaliteitscontrole gevolgd door demultiplexen, generatie van FASTQ-bestanden, uitlijning en variantbepaling. Demultiplexen scheidt gegevens van gepoolde bibliotheken op basis van de unieke

sequencing-indexen die zijn toegevoegd tijdens de procedure voor bibliotheekpreparatie. Er worden tussentijdse FASTQ-bestanden gegenereerd die de sequencing-bepalingen bevatten voor elk monster en de kwaliteitsscores, met uitzondering van bepalingen van eventuele clusters die niet door het filter kwamen. De sequencing-bepalingen worden vervolgens uitgelijnd ten opzichte van een referentiegenoom om een relatie tussen de sequenties te identificeren, en ze krijgen een score toegekend op basis van de gebieden met gelijkheid. Uitgelijnde bepalingen worden weggeschreven naar bestanden met een BAM-indeling. De software voor het assay maakt gebruik van afzonderlijke algoritmes voor bibliotheken die zijn gegenereerd uit DNA- en/of RNA-monsters voor het bepalen van kleine DNA-varianten, genamplificaties, TMB en MSI bij DNA-monsters en fusies en splicevarianten bij RNA-monsters. Er worden meerdere outputbestanden gegenereerd door de analysesoftwaremodule, waaronder sequencingmetrieken en VCF-bestanden ('Variant Call Format', variantbepalingsopmaak). VCF-bestanden bevatten informatie over varianten die op specifieke posities in een referentiegenoom zijn gevonden. Voor elk monster worden sequencingstatistieken en afzonderlijke uitvoerbestanden gegenereerd. Raadpleeg de *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)* voor meer informatie over secundaire en tertiaire analyse.

- **Tertiaire analyse**—Tertiaire analyse, uitgevoerd door de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule, bestaat uit TMB- en MSI-berekeningen, bepalingen voor begeleidende diagnostiek, tumorprofilering van varianten in twee niveaus van klinische relevantie aan de hand van een kennisbank (KB) en het weefseltype en het genereren van een resultatenrapport. Naar tumorprofilering kan ook worden verwezen als uitgebreide genomische profilering. De geïnterpreteerde variantresultaten en de TMB- en MSI-biomarkerresultaten worden samengevat in het TSO Comprehensive (EU)-resultatenrapport.

Beperkingen van de procedure

Alleen voor gebruik bij *in vitro*-diagnostiek.

- Uitsluitend voor gebruik op recept. De test moet worden gebruikt in overeenstemming met klinische laboratoriumvoorschriften.
- Genomische bevindingen vermeld in [Tabel 2](#) voor het beoogde gebruik zijn niet voorschrijvend of afdoende voor gelabeld gebruik van enig specifiek therapeutisch product.
- Voor varianten die in het TSO Comprehensive (EU)-resultatenrapport staan vermeld onder Genomische bevindingen met bewijs van klinische significantie (niveau 2) en Genomische bevindingen met potentiële klinische significantie (niveau 3), is geen klinische validatie uitgevoerd.
- Beslissingen met betrekking tot patiëntenzorg en behandeling moeten gebaseerd worden op het onafhankelijke medische oordeel van de behandelend arts, waarbij rekening moet worden gehouden met alle van toepassing zijnde informatie over de toestand van de patiënt, zoals de geschiedenis van de patiënt en diens familie, lichamelijke onderzoeken, informatie van andere diagnostische tests en patiëntvoorkeuren, in overeenstemming met de zorgstandaard in een bepaalde gemeenschap.

- De kwaliteit van FFPE-monsters is zeer variabel. Monsters die geen standaard fixatieprocedures hebben ondergaan, genereren mogelijk geen geëxtraheerde nucleïnezuren die voldoen aan de vereisten voor kwaliteitscontrole van de assay ([Kwaliteitscontrole op pagina 81](#)). FFPE-blokken die langer dan vijf jaar zijn bewaard, vertonen een lagere validiteit.
- De prestatie van TSO Comprehensive (EU) bij monsters die zijn verkregen van patiënten die een orgaan- of weefseltransplantatie hebben ondergaan, is niet geëvalueerd.
- Grote hoeveelheden necrotisch weefsel ($\geq 23\%$) kunnen het vermogen van het TSO Comprehensive (EU)-assay om genamplificaties en RNA-fusies te detecteren, verstoren.
- Detectie van somatische drivermutaties kan onbetrouwbaar zijn als de tumorinhoud (per gebied) minder dan 20% bedraagt.
- Een uitslag van microsatelliet-stabiel (MS-stabiel) kan onbetrouwbaar zijn bij een tumorinhoud van minder dan 30%. Een uitkomst van microsatelliet-instabiliteit hoog (MSI-hoog) is betrouwbaar, ongeacht het tumorinhoud.
- Hemoglobine geassocieerd met weefsel vermindert ondersteunende aflezingsen voor MET-splicingvarianten.
- Bij sterk herschikte genomen met deleties en verlies van heterozygositeit kan de TSO Comprehensive (EU)-software een DNA-monster ten onrechte als besmet classificeren (CONTAMINATION_SCORE > 3106 en p-waarde > 0,049).
- Een negatief resultaat sluit de aanwezigheid van een mutatie onder de detectielimieten (LoD) van de assay niet uit.
- De gevoeligheid voor detectie van kleine DNA-varianten kan worden beïnvloed door:
 - lage complexiteit van de genomische context;
 - toenemende variantlengte.
- TMB-scores kunnen in de volgende contexten onjuist zijn:
 - als de tumorinhoud niveaus bereikt waar de kiemlijn en somatische variantalfrequenties (VAF's) samenkomen;
 - in populaties die niet goed zijn vertegenwoordigd in openbare databases.
- Genamplificaties zijn de enige kopieaantal varianten die worden gemeld door TSO Comprehensive (EU). Gendeleties worden niet gerapporteerd door de assay.
- De algoritmen voor fusiebepaling in de TSO Comprehensive (EU)-assaysoftware houden mogelijk geen rekening met bewijs van aflezingsen die zich buiten de geannoteerde gengrenzen uitstrekken.
- De gevoeligheid voor detectie van fusie kan beïnvloed worden:
 - door een lage complexiteit van de bibliotheek, wat resulteert in minder ondersteunende uitlezingen als gevolg van afwijkingen in de workflow voor de assay (bijvoorbeeld, volg de mengstappen in [Denaturatie en hybridisatie RNA op pagina 44](#));
 - als één enkel gen beide breekpunten bestrijkt;

- in gevallen waarbij meerdere fusiebreekpunten erg dicht bij elkaar liggen, met één of meerdere partners; de meerdere breekpunten en partners zouden dan als één breekpunt en partner kunnen worden gerapporteerd;
- door kleine mediane wisselplaatmaten. Een minimale mediane insertiegrootte van 80 bp is vereist, maar de gevoeligheid neemt af in het bereik van 80-100 bp;
- door een lage complexiteit van de sequentie of homologe genomische context rond fusiebreekpunten.
- De resolutie van de genen betrokken bij een fusie kan beïnvloed raken als fusiebreekpunten optreden in genomische gebieden met overlappende genen. De assay rapporteert alle genen, gescheiden door puntkomma's, als er meerdere genen een breekpunt overlappen.
- Inconsistente dekking in het TERT Promoter-gebied kan resulteren in 'Geen resultaat' als gevolg van lage diepte.
- Annotatie- of KB-fouten kunnen een vals positief of vals negatief resultaat veroorzaken, waaronder het opnemen van een variant in het verkeerde niveau (tussen Genomische bevindingen met bewijs van klinische significantie [niveau 2] en Genomische bevindingen met potentiële klinische significantie [niveau 3]), of de annotatiegegevens in het rapport kunnen onjuist zijn. Fouten in de annotatie of de kennisbank hebben geen invloed op de varianten die worden gerapporteerd in de CDx-resultaten. De volgende drie bronnen kunnen fouten veroorzaken:
 - TSO Comprehensive (EU)-variantannotatie. Er is een foutpercentage van ongeveer 0,0027% op basis van een analyse van 2.448.350 varianten uit COSMIC v92, daardoor is er een kleine kans op fouten.
 - Fout in de kennisbank als gevolg van het curatieproces.
 - De relevantie van KB-inhoud verandert met het verloop van tijd. Dit rapport weerspiegelt de kennis op het moment dat de versie van de kennisbank werd samengesteld.
- TSO Comprehensive (EU) is ontworpen voor het rapporteren van somatische varianten bij rapportage van varianten met bewijs van klinische relevantie of varianten met mogelijke klinische relevantie. Aangezien het een test is die alleen op tumoren is gericht, is rapportage over kiemlijn (erfelijke) varianten mogelijk, maar onbedoeld. TSO Comprehensive (EU) gebruikt een kennisbank om varianten te melden, zonder expliciet te annoteren of ze van kiemlijn- of somatische oorsprong zijn.
- De kennisbank bevat alleen therapeutische, diagnostische en prognostische associaties die relevant zijn voor varianten in een vastgesteld, solide, kwaadaardig neoplasma. Gevoeligheids- of kankerrisicoassociaties zijn niet opgenomen in de kennisbank.
- De volgende tabel toont de nucleotideveranderingen voor drie RET-varianten die de assay niet kan detecteren. Andere nucleotideveranderingen voor dezelfde aminozuurverandering kunnen wel worden gedetecteerd.

Tabel 3 Nucleotideveranderingen voor drie RET-varianten

Wijziging aminozuur	Chr*	Positie	Reference Allele	Alternatief
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 = chromosoom

Productonderdelen

De TSO Comprehensive (EU)-test bestaat uit de volgende onderdelen:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) kit (Illuminacatalogusnr. 20063092)—De kit bevat reagentia met voldoende volume om 24 DNA- en 24 RNA-bibliotheken te genereren. Dit deel omvat patiëntmonsters en controles. Controles worden afzonderlijk verkocht (raadpleeg [Benodigde, maar niet meegeleverde reagentia op pagina 17](#)).
- Kennisbank: Regelmatig bijgewerkt en beschikbaar om te downloaden op het Illumina Lighthouse Portal.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (Illumina catalogusnr. 20051843), die de volgende onderdelen bevat:
 - TSO Comprehensive Claimpakketten
 - TSO Comprehensive Software Suite
 - TSO Comprehensive USB-set

Een Illumina servicevertegenwoordiger installeert de juiste versie van de Analysemodule voor TSO Comprehensive (EU) op de Local Run Manager NextSeq 550Dx-instrument. Raadpleeg Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661) voor informatie over de analysemodule.

Reagentia

Meegeleverde reagentia

De volgende reagentia worden meegeleverd met de TSO Comprehensive (EU)-kit.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, onderdeelnr. 20031127

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en nucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten, DNA polymerase, RNase H en nucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en willekeurige hexameren bevat	-25 °C tot -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Gebufferde waterige oplossing die reverse-transcriptase bevat	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), onderdeelnr. 20031118

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Gebufferde waterige oplossing die T4 DNA polymerase en polynucleotidekinase bevat	-25 °C tot -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en nucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat	-25 °C tot -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Gebufferde waterige oplossing die ligase bevat	-25 °C tot -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en universalsequencing-oligonucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en universalsequencing-oligonucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat	-25 °C tot -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gebufferde waterige oplossing die DNA polymerase en nucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), onderdeelnr. 20031119

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat	2 °C tot 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Waterige oplossing die magnetische parels bevat	2 °C tot 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-oplossing	2 °C tot 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, onderdeelnr. 20031120

Werkzame bestanddelen: Gebufferde waterige oplossing die oligonucleotide-primers met afzonderlijke barcodes bevat.



LET OP

Gebruik unieke indexprimers (UPxx) voor RNA- of DNA-monsters. Combineer CPxx- en UPxx-indexprimers niet met elkaar in dezelfde bibliotheek.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, onderdeelnr. 20031126

Werkzame bestanddelen: Gebufferde waterige oplossing die oligonucleotide-primers met afzonderlijke barcodes bevat.



LET OP

Gebruik combinatie-indexprimers (CPxx) alleen voor DNA-monsters. Combineer CPxx- en UPxx-indexprimers niet met elkaar in dezelfde bibliotheek.

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

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), onderdeelnr. 20031123

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Gebufferde waterige oplossing die formamide en zouten bevat	2 °C tot 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Gebufferde waterige oplossing met zouten en paramagnetische parels in de vaste fase covalent gecoat met streptavidine	2 °C tot 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxideoplossing	2 °C tot 8 °C

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Gebufferde waterige oplossing	2 °C tot 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Gebufferde waterige oplossing met paramagnetische parels in de vaste fase	2 °C tot 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat, 2-mercapto-ethanol en formamide	2 °C tot 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat	2 °C tot 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat	2 °C tot 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Waterige oplossing die magnetische parels bevat	2 °C tot 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), onderdeelnr. 20031121

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Gebufferde waterige oplossing die oligonucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat	-25 °C tot -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Gebufferde waterige oplossing die reinigingsmiddel bevat	-25 °C tot -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gebufferde waterige oplossing die DNA polymerase en nucleotiden bevat	-25 °C tot -15 °C

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Gebufferde waterige oplossing die P5- en P7-primers bevat	-25 °C tot -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat, 2-mercapto-ethanol en formamide	-25 °C tot -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 of PhiX)	20031492	1	10 µl	Gebufferde waterige oplossing die PhiX genomisch DNA bevat	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, onderdeelnr. 20031122

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonucleotide probepool	-25 °C tot -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonucleotide probepool	-25 °C tot -15 °C

Benodigde, maar niet meegeleverde reagentia

Reagentia vóór amplificatie

- DNA and RNA extraction and purification reagents - Raadpleeg [Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27](#) voor de vereisten voor reagentia.
- DNA and RNA quantification reagents - Raadpleeg [Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27](#) voor de vereisten voor reagentia.
- TruSight Oncology Controles:
 - TruSight Oncology DNA controle (Illumina-catalogusnr. 20065041)
 - TruSight Oncology RNA controle (Illumina-catalogusnr. 20065042)
- Ethanol (EtOH) 100% (200 proof), moleculair biologische kwaliteit.
- RNase/DNase-vrij water

Reagentia na amplificatie

- NextSeq 550Dx Reagenscartridge met hoge output v2.5 (300 cycli) (Illumina catalogusnr. 20028871)
 - NextSeq 550Dx Stroomcelcartridge met hoge output v2.5 (300 cycli)
 - NextSeq 550Dx Reagenscartridge met hoge output v2 (300 cycli)
 - NextSeq 550Dx Buffercartridge v2 (300 cycli)
- EtOH 100% (200 proof), moleculair biologische kwaliteit
- RNase/DNase-vrij water

Hantering en opslag van reagentia

De volgende dozen met reagentia worden ingevroren verzonden. Bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Doos	Onderdeelnummer	Labgebied
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pre-amp
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amp
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post-amp
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amp



LET OP

Bewaar reagentia niet in een -vorstvrije opslagunit of in een deurvak van een koelkast.

De volgende dozen met reagentia worden verstuurd op gelpacks bij een constante temperatuur van 0 °C tot 10 °C. Bewaar bij 2 °C tot 8 °C.

Doos	Onderdeelnummer	Labgebied
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post-amp



LET OP

Vries reagentia met parels (LNB1, SPB en SMB) niet in.

- Uiterlijke veranderingen in de reagentia kunnen duiden op kwaliteitsverslechtering van de materialen. Als er sprake is van uiterlijke veranderingen (zoals duidelijke veranderingen in de kleur van het reagens of troebelheid), mogen de reagentia niet worden gebruikt.

- FSM, SSM, ERA1-B en TCB1 kunnen productgerelateerde deeltjes bevatten. Volg de specifieke hanteringsrichtlijnen voor elk reagens. Na het uitvoeren van de FSM- en SSM-mengstappen zullen resterende witte productgerelateerde deeltjes geen invloed hebben op de prestaties.
- De stabiliteit van het TSO Comprehensive (EU)-assay is beoordeeld en de prestaties zijn aangetoond voor maximaal vier keer gebruik van de kit. Reagentia zijn stabiel mits opgeslagen bij de aangegeven temperaturen en tot de aangegeven vervaldatum vermeld op het label op de doos.

Apparatuur en materialen

Benodigde, maar niet meegeleverde apparatuur en materialen

Apparatuur en materialen voor pre-amplificatie

Apparatuur	Leverancier
Ultrasonicator met bijbehorende accessoires Zie Configuratie-instellingen voor de ultrasonicator voor DNA-fragmentatie op pagina 23 .	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Thermocycler met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Verwarmd deksel dat kan worden ingesteld op 30 °C en 100 °C (of kan worden uitgeschakeld als 30 °C niet mogelijk is) • Omvat een temperatuurbereik van 4 °C tot 99 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ± 0,25 °C • Compatibel met PCR-platen met 96-wells, 0,2 ml • Raadpleeg Stijgingsnelheid thermocycler op pagina 24 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Vortexer	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Micromonsterincubators (2) met inzetstukken voor 96-wells MIDI-platen (2)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifuge	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Plaatcentrifuge met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Compatibel met microplaten met 96 monsterwells • Vermogen van 280 x g (+/- 10%) 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Plaatschudder met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Orbitale straal van 2 mm • Kan schudden met 1200 tpm en 1800 tpm 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur	Leverancier
Afsluitwig of sealroller	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Magnetische standaard met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Ontworpen voor precipitatie/separatie van paramagnetische parels • Magneten aan de zijkant van de standaard (niet aan de onderkant) • Compatibel met MIDI-platen met 96 monsterwells 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Precisiepipetten die nauwkeurig volumes tussen 2 µl en 1000 µl kunnen toedienen met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Enkel- of meerkanaalspipet met stapgrootte van 0,02 µl • Enkel- of meerkanaalspipet met stapgrootte van 0,1 µl, 0,2 µl, of 0,5 µl • Enkel- of meerkanaalspipet met stapgrootte van 1 µl of 2 µl Pipetten moeten regelmatig worden gekalibreerd en moeten nauwkeurig zijn binnen 5% van het vermelde volume.	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipethulpmiddel	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
IJs of koelblok	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
serologische pipetten van 10 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Klevende afdichting voor platen met 96 wells met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Afpelbaar • Geschikt voor volledig of gedeeltelijk omrande PCR-platen • Sterk klefmiddel dat meerdere temperatuurveranderingen van -20 °C tot 100 °C kan weerstaan • DNase/RNase-vrij 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifugebuisjes van 1,7 ml, nucleasevrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Reagensreservoirs zonder nuclease (wegwerpbakje, 50 ml) (of gelijkwaardig)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
15 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
50 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Compatibele aërosolbestendige pipetpunten	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur	Leverancier
96-wells opslagplaten, 0,8 ml (MIDI-platen)	Fisher Scientific, onderdeelnr. AB-0859 of gelijkwaardig
PCR-platen met 96 wells compatibel met thermocycler, 0,2 ml (polypropyleen wells)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur en materialen voor post-amplificatie

Apparatuur	Leverancier
NextSeq 550Dx-instrument	Illumina, catalogusnr. 20005715
Plaatcentrifuge met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Compatibel met microplaten met 96 monsterwells • Vermogen van 280 x g (+/- 10%) 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Thermocycler met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Verwarmd deksel (100 °C) • Omvat een temperatuurbereik van 4 °C tot 99 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ± 0,25 °C • Compatibel met PCR-platen met 96-wells, 0,2 ml • Raadpleeg Stijgingssnelheid thermocycler op pagina 24 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Vortexer	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Micromonsterincubator met inzetstuk voor MIDI-platen met 96 wells	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Verwarmingsblok droge warmte met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatuurbereik 25 °C tot 99 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ± 5 °C • Zorg ervoor dat de microcentrifugebuisjes compatibel zijn met het verwarmingsblok 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Plaatschudder met de volgende specificaties: <ul style="list-style-type: none"> • Orbitale straal van 2 mm • Kan schudden met 1200 tpm en 1800 tpm 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifuge	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Afsluitwig of sealroller	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur	Leverancier
<p>Magnetische standaard met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ontworpen voor precipitatie/separatie van paramagnetische parels • Magneten aan de zijkant van de standaard (niet aan de onderkant) • Compatibel met MIDI-platen met 96 monsterwells 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
<p>Precisiepipetten die nauwkeurig volumes tussen 2 µl en 1000 µl kunnen toedienen met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enkel- of meerkanaalspipet met stapgrootte van 0,02 µl • Enkel- of meerkanaalspipet met stapgrootte van 0,1 µl, 0,2 µl, of 0,5 µl • Enkel- of meerkanaalspipet met stapgrootte van 1 µl of 2 µl <p>Pipetten moeten regelmatig worden gekalibreerd en moeten nauwkeurig zijn binnen 5% van het vermelde volume.</p>	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipethulpmiddel	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
serologische pipetten van 10 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
<p>Klevende afdichting voor platen met 96 wells met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Afpelbaar • Geschikt voor volledig of gedeeltelijk omrande PCR-platen • Sterk klefmiddel dat meerdere temperatuurveranderingen van -20 °C tot 100 °C kan weerstaan • DNase/RNase-vrij 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifugebuisjes van 2 ml, nucleasevrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifugebuisjes van 1,7 ml, nucleasevrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Reagensreservoirs zonder nuclease (wegwerpbakje, 50 ml) (of gelijkwaardig)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
15 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
50 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Compatibele aërosolbestendige pipetpunten	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
96-wells opslagplaten, 0,8 ml (MIDI-platen)	Fisher Scientific, onderdeelnr. AB-0859 of gelijkwaardig

Apparatuur	Leverancier
PCR-platen met 96 wells compatibel met thermocycler, 0,2 ml (polypropyleen wells)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
IJs of koelblok	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Configuratie-instellingen voor de ultrasonicator voor DNA-fragmentatie

DNA-fragmentatie of shearing is van invloed op de prestaties van het assay doordat de verdeling van de fragmentgrootte wordt bepaald, die op zijn beurt weer de dekking van de sequencing beïnvloedt. Er zijn verschillende gefocuste ultrasonicatieconfiguraties geëvalueerd en geoptimaliseerd voor het TSO Comprehensive (EU)-assay ([Tabel 4](#)).

- De tijd voor shearing werd aangepast om de meting voor MEDIAN_EXON_COVERAGE te maximaliseren, zoals aangegeven in het gedeelte [Kwaliteitscontrole op pagina 81](#). De shearingtijden (zie [Tabel 4](#)) en de resultaten van MEDIAN_INSERT_SIZE verschilden per configuratie.
- Configuraties 1–4 en 6 werden getest met glazen buisjes met 8 strepen. Configuratie 5 maakte gebruik van één glazen buisje. De volumecapaciteiten van de buisjes worden weergegeven in [Tabel 4](#).
- Optimalisatie van configuraties 3–6 (kleinere waterbadvolumes) gebruikte pulsatie.
- Configuraties 3–5 werden gesheared in kleinere volumebuisen. Volumecapaciteiten van de buisjes hebben invloed op de shearingparameters.
- Configuratie 4 (lijntransducer, middelgroot waterbadvolume, ontgast water) vereiste een lange vertragingstijd voor het pulseren (40 seconden) om vergelijkbare MEDIAN_EXON_COVERAGE te bereiken als configuratie 1 en 2 bij een nominale ingang van 40 ng.
- Optimale instellingen voor configuratie 3 resulteerden in een iets grotere fragmentgrootteverdeling in vergelijking met de andere configuraties (MEDIAN_INSERT_SIZE was ongeveer 5-10 basenparen groter).
- In configuraties 3 en 5 werd gebruikgemaakt van niet-ontgast water en het minimale waterbadvolume.
- Configuraties 3 en 5 hadden een verhoogde DNA-invoer nodig (50 ng voor configuratie 3, 60 ng voor configuratie 5) om een vergelijkbare MEDIAN_EXON_COVERAGE te bereiken ten opzichte van de andere 4 configuraties, die de nominale invoer van 40 ng gebruikten.
- Configuraties 3 en 5 hebben meer beschadiging en/of denaturatie en daardoor een kleinere effectieve massa van bruikbare dsDNA-moleculen voor bibliotheekbereiding.

Centrifugeer de buisjes voor shearing tijdens het terugwinproces om te waarborgen dat het gespecificeerde volume wordt teruggewonnen, omdat elk verlies van materiaal de prestaties negatief kan beïnvloeden.

Tabel 4 Geëvalueerde gefocuste ultrasonicatorconfiguraties

Parameter	Configuratie					
	1	2	3	4	5	6
Transducer	Lijn	Punt	Punt	Lijn	Punt	Lijn
Waterbadvolume	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Ontgast water	Ja	Ja	Nee	Ja	Nee	Ja
Waterkoeler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Waterbadtemperatuur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Piek-incidentievermogen (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% inschakelduur	30	10	30	25	20	25
Cycli per burst	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsering (bursts van 10 seconden)	Nee	Nee	Ja	Ja	Ja	Ja
Vertragingstijd pulseren	N.v.t.	N.v.t.	10 s	40 s	10 s	10 s
Tijd voor shearing	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Monsterverwerking	1-8	1	1	1-8	1	1-8
Batchgrootte	1-96	1-96	1-8	1-8	1	1-96
Monstergrootte glazen buis 8 strips	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkele buis (50 µl)	130 µl (of 96 microBUISPlaat)
Dithering	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	3 mm in Y-richting bij 20 mm/s	N.v.t.	1,5 mm in Y-richting bij 10 mm/s
DNA-invoerequivalent (voor mediane exondekking)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ De 200 seconden van de tijd voor shearing bestaat uit bursts van 10 seconden, die 20 maal worden herhaald.

² De 320 seconden van de tijd voor shearing bestaat uit bursts van 10 seconden, die 32 maal worden herhaald.

Stijgingsnelheid thermocycler

De oploopsnelheid van thermisch cyclen is van invloed op de QC-meetwaardes van de assay (bruikbare MSI-locaties, mediane bin-telling CNV-doel, mediane grootte van het inzetstuk (RNA)) en ondersteunende bepalingen voor splice-varianten en fusies. Optimalisatie van de stijgingsnelheid van de thermocycler wordt

aanbevolen. Een getest model werd bijvoorbeeld aangepast van een standaard (en maximale) oploopsnelheid van 5 °C/s naar 3 °C/s om vergelijkbare resultaten te krijgen met andere modellen met lagere standaard oploopsnelheden.

Verzamelen, transport en opslag van monsters

Volg de standaardprocedures bij het verzamelen, vervoeren, bewaren en verwerken van monsters.

Monstervereisten

FFPE-weefsel

Het TSO Comprehensive (EU)-assay vereist 40 ng RNA en/of 40 ng DNA dat is geëxtraheerd uit FFPE-weefsel. Het gebruik van zowel RNA als DNA maakt analyse van alle geclaimde varianttypes mogelijk. Weefsel moet worden gefixeerd met behulp van een formalinefixeermiddel dat geschikt is voor moleculaire analyses (bijvoorbeeld 10% neutraal-gebufferde formaline). Weefsel mag niet worden ontkalkt. Voordat u het TSO Comprehensive (EU)-assay uitvoert, moet het weefselmonster door een patholoog worden onderzocht om er zeker van te zijn dat het geschikt is voor deze test. Er is een minimum van 20% tumorinhoud (per gebied) vereist om somatische driver-mutaties te detecteren. Betrouwbare detectie van MSI-status in verschillende monsters vereist een minimum van 30% tumorinhoud. Als een monster wordt getest met een tumorinhoud van minder dan 30% om resultaten met andere varianttypen te bepalen, kan een MS-stabiel resultaat onbetrouwbaar zijn. Een MSI-hoog resultaat is correct, ongeacht de tumorinhoud.

De tumorinhoud voor genamplificaties en RNA-varianten is afhankelijk van de mate van amplificatie of fusie-expressie (raadpleeg [Tumorinhoud op pagina 105](#)).

Voor een grote kans op extractie van 40 ng RNA en 40 ng DNA uit verschillende vaste weefseltypen is het aanbevolen weefselvolume $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Dit volume komt overeen met een cumulatief levensvatbaar weefselgebied van $\geq 200 \text{ mm}^2$ met $5 \mu\text{m}$ dikke secties, of $\geq 100 \text{ mm}^2$ met $10 \mu\text{m}$ dikke secties. Cumulatief weefselgebied is de som van het levensvatbare weefselgebied in alle secties die zijn ingediend voor extractie. Een cumulatief weefselgebied van 200 mm^2 kan bijvoorbeeld worden verkregen door vier secties van $5 \mu\text{m}$ met elk 50 mm^2 aan weefselgebied of vijf secties van $10 \mu\text{m}$ met elk 20 mm^2 aan weefselgebied te extraheren. Weefselnecrose kan de hoeveelheid opbrengst van nucleïnezuur verlagen. Om de mogelijkheid van fout-negatieve resultaten tot een minimum te beperken, kan macrodissectie worden toegepast op het weefsel om de gewenste levensvatbare tumorinhoud te bereiken.

Grote hoeveelheden necrotisch weefsel ($\geq 23\%$ per weefselgebied) kunnen het vermogen van het TSO Comprehensive (EU)-assay om genamplificaties en RNA-fusies te detecteren, verstoren. Als het monstergedeelte meer dan 23% necrotische inhoud bevat in het totale weefselgebied, moet het necrotische weefsel op macroniveau worden weggesneden. Als het laboratorium RNA uitvoert met de assay, moet weefsel met hemoglobine worden vermeden of tot een minimum worden beperkt bij het verkrijgen van plakjes uit het weefselblok. Zie [Interfererende stoffen op pagina 96](#).

FFPE-weefsel op een objectglasje kan maximaal 28 dagen bij kamertemperatuur worden bewaard.

Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren

- Extraheer met commercieel verkrijgbare extractiekits RNA en DNA uit FFPE-weefselmonsters. Verschillen in extractiekits kunnen van invloed zijn op de prestaties. Raadpleeg [Evaluatie nucleïnezuur-extractiekit op pagina 94](#).
- Verhoog Proteïnase K of een gelijkwaardig enzym niet tijdens de extractie uit de standaardconcentratie die in een extractiekit wordt geleverd. Zie [Interfererende stoffen op pagina 96](#).
- Bewaar voorraad geëxtraheerd nucleïnezuur volgens de instructies van de fabrikant van de extractiekit.
- Bewaar geëxtraheerd DNA gedurende maximaal 28 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
- Bewaar geëxtraheerd RNA gedurende maximaal 28 dagen bij -85 °C tot -65 °C.
- Om veranderingen in de concentratie in de loop van de tijd te voorkomen, dient u DNA en RNA binnen 28 dagen na aanvang van de bibliotheekbereiding te meten. Kwantificeer het RNA en DNA met een fluorometrische kwantificatiemethode die gebruik maakt van kleurstoffen die nucleïnezuur binden. De nucleïnezuurconcentratie moet het gemiddelde van de laatste drie metingen zijn.
- Voor de assay is 40 ng van elk RNA-monster nodig, bereid in RNase/DNase-vrij water (niet meegeleverd), met een eindvolume van 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Voor de assay is 40 ng van elk gDNA-monster met een minimale extractieconcentratie van 3,33 ng/µl nodig. Voor shearing is een eindvolume van 52 µl (0,77 ng/µl) nodig met minimaal 40 µl TEB (geleverd) dat wordt gebruikt als verdunningsmiddel.

Bibliotheekopslag

Bibliotheeken 7 tot 32 dagen opslaan in PCR-platen met lage binding, afhankelijk van het type bibliotheek (raadpleeg [Tabel 5](#)).

Tabel 5 Bibliotheekopslagtijden

Bibliotheektype	Plaat	Aantal dagen	Opslagtemperatuur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C tot -15 °C
Gefragmenteerd gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C tot -15 °C
Vóór verrijking	ALS PCR	≤ 30	-25 °C tot -15 °C
Na verrijking	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C tot -15 °C
PCR na verrijking	PL PCR	≤ 30	-25 °C tot -15 °C
Genormaliseerd	NL PCR	≤ 32	-25 °C tot -15 °C

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Veiligheid



WAARSCHUWING

Deze set reagentia bevat mogelijk gevaarlijke chemicaliën. Inademen, inslikken en contact met de huid en de ogen kan persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Er moet voldoende ventilatie zijn wanneer er met gevaarlijke materialen in reagentia wordt gewerkt. Draag beschermende uitrusting, waaronder oogbescherming, handschoenen en een geschikte laboratoriumjas. Draag beschermende uitrusting, waaronder oogbescherming, handschoenen en een geschikte laboratoriumjas om de kans op blootstelling aan schadelijke stoffen te minimaliseren. Raadpleeg voor aanvullende informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid het veiligheidsinformatieblad op support.illumina.com/sds.html.

- Hanteer alle specimens alsof dit besmettelijke stoffen zijn.
- Volg de standaard voorzorgsmaatregelen die in het laboratorium gelden. Pipetteer niet met de mond. Niet eten, drinken of roken in de aangegeven werkgebieden. Draag wegwerphandschoenen en een laboratoriumjas bij het hanteren van monsters en assayreagentia. Was de handen grondig na het hanteren van monsters en assayreagentia.

Laboratorium

- Richt het laboratorium in met een unidirectionele workflow om besmetting te voorkomen. Zones voor pre-amplificatie en post-amplificatie moeten voorzien zijn van speciale apparatuur en materialen (bijvoorbeeld, pipetten, pipettips, vortexer en centrifuge). Om overdracht van het amplificatieproduct of de probe te voorkomen moet u na het betreden van de post-amplificatiezone het terugkeren naar de pre-amplificatiezone vermijden.
- Voer de stappen 'PCR indexeren' en 'Verrijking' uit in een post-amplificatiezone om overdracht van amplificatieproduct te voorkomen.
- De procedures voor bibliotheekpreparatie vereisen een RNase/DNase-vrije omgeving. Ontsmet de werkgebieden grondig met een RNase/DNase-remmend reinigingsmiddel. Gebruik plastic dat gecertificeerd vrij is van DNase, RNase en menselijk genomisch DNA.
- Reinig bij post-amplificatieprocedures vóór en na elke procedure de oppervlakken en apparatuur grondig met een vers gemaakte oplossing van 0,5% natriumhypochloriet (NaOCl). Laat de oplossing 10 minuten contact maken met de oppervlakken en veeg het daarna grondig af met 70% ethyl- of isopropylalcohol.
- Gebruik nuclease-vrije microcentrifugebuisjes, platen, pipettips en reservoirs.
- Gebruik tijdens het gehele assay gekalibreerde apparatuur. Zorg ervoor dat de apparatuur is gekalibreerd op de snelheden, temperaturen en volumes die in dit protocol worden gespecificeerd.

- Gebruik precisiepipetten om een nauwkeurige reagens- en monsterafgifte te garanderen. Kalibreer regelmatig in overeenstemming met de specificaties van de fabrikant.
- Gebruik de volgende richtlijnen bij het gebruik van meerkanaalse pipetten:
 - Pipetteer minimaal $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Zorg ervoor dat barrièretips goed passen en geschikt zijn voor het merk en model van de meerkanaalspipet.
 - Bevestig tips in een vloeiende, rollende beweging om er zeker van te zijn dat de tips allemaal even goed zijn bevestigd.
 - Aspireer in een hoek van 90° met gelijke volumes vloeistof bij alle tips.
 - Meng na levering alle componenten door het reactiemengsel op en neer te pipetteren.
 - Controleer na de afgifte of er uit elke tip volledig vloeistof is vrijgekomen.
- Zorg ervoor dat u alleen apparatuur gebruikt die is gespecificeerd voor de assay en dat u de programma's volgens de aanwijzingen instelt.
- De vermelde temperaturen voor de thermocycler en de micromonsterincubator geven de reactietemperatuur aan, niet per se de ingestelde temperatuur van de apparatuur.

Assay

- Vermijd kruisbesmetting.
 - Volg de betreffende laboratoriumpraktijken bij het hanteren van monsters en reagentia.
 - Gebruik verse verbruiksmaterialen voor laboratoria en verse pipettips tussen monsters en tussen het dispensereren van reagentia.
 - Gebruik aerosolbestendige tips om het risico op kruisbesmetting te verkleinen.
 - Gebruik een unidirectionele workflow wanneer u van zones voor pre-amplificatie naar zones voor post-amplificatie gaat.
 - Hanteer en open slechts één indexprimer per keer. Plaats na gebruik onmiddellijk de dop terug op elk indexbuisje. In de kit zitten extra dopjes.
 - Verwissel regelmatig uw handschoenen, maar ook als ze in contact zijn geweest met indexprimers of monsters.
 - Verwijder buisjes met ongebruikte indexprimer uit het werkgebied.
 - Plaats reagentia niet terug in voorraadbuisjes na gebruik met een buisjesstrip, bak of reservoir.
 - Meng monsters met een pipet en centrifugeer de plaat wanneer dat wordt aangegeven.
 - Gebruik een microplaatshudder. Vortex de platen niet.
- Wissel de assay-onderdelen van verschillende reagenskitpartijen niet onderling uit. Reagenskitpartijen worden geïdentificeerd op het etiket van de doos van de reagenskit en het hoofdpartijblad.

- Goede laboratoriumpraktijken zijn vereist om te voorkomen dat reagentia, instrumenten, monsters en bibliotheken worden verontreinigd door nucleasen en PCR-producten. Besmetting met een nuclease en een PCR-product kan onjuiste en onbetrouwbare resultaten veroorzaken.
- Het juiste plaattype is vereist voor optimale assayprestaties en opslag. Zorg ervoor dat u de instructies voor plaatoverdracht in de [Gebruiksaanwijzing op pagina 39](#) volgt.
- Wanneer de omschreven procedures niet worden gevolgd, kunnen de resultaten onjuist zijn of kan de bibliotheekwaliteit significant slechter zijn.
- Tenzij er in de [Gebruiksaanwijzing op pagina 39](#) een veilig stoppunt is aangegeven, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.
- Bewaar de reagentia of componenten van de assay op de gespecificeerde temperatuur in de daarvoor aangewezen zones voor pre--amplificatie en post--amplificatie.
- Bewaar reagentia niet in een vorstvrije opslagunit of in een deurvak van een koelkast.
- Vries reagentia met parels (LNB1, SPB en SMB) niet in.
- Gebruik geen reagentia die niet juist zijn bewaard.
- Wijk niet af van de procedures voor mengen en hanteren die voor elk reagens zijn gespecificeerd. Onvolledig mengen of overmatig vortexen van reagentia kan resulteren in mislukte monsterresultaten.
- FSM, SSM, ERA1-B en TCB1 kunnen productgerelateerde deeltjes bevatten. Volg de hanteringsrichtlijnen voor elk specifiek reagens. Na het uitvoeren van de FSM- en SSM-mengstappen zullen resterende witte productgerelateerde deeltjes geen invloed hebben op de prestaties.
- Bereid vers mastermengsel en gooi het resterende volume na gebruik weg.
- Bereid verse 80% ethanol altijd met RNase/DNase-free water voor de wasstappen. Ethanol kan water uit de lucht absorberen, wat invloed kan hebben op de resultaten. Gooi 80% ethanol na gebruik weg in overeenstemming met lokale, provinciale en/of nationale voorschriften.
- Breng het gespecificeerde eluaatvolume over. Het overbrengen van minder dan het gespecificeerde volume eluaat tijdens de elutiestappen kan de resultaten beïnvloeden.
- Gebruik de volgende richtlijnen voor ultrasonicatoren. Zorg ervoor dat u de instructies van de fabrikant volgt.
 - Plaats het gDNA langzaam in het ultrasonicatorbuisje om de vorming van luchtbellen te voorkomen. Te veel bellen of een luchtholte in het shearing-buisje kan leiden tot onvolledige fragmentatie.
 - Langzaam in de ultrasonicatorbuisjes dispensereren en voorkom spatten.
 - Steek bij het verwijderen van gefragmenteerd DNA de pipettip niet in de bodem van het ultrasonicatorbuisje, om verplaatsing van vloeistof en verlies van monster te voorkomen.
- Pipetteer niet minder dan 2 µl monsterinvoer.
- Gebruik geen bak om reagentia weg te gooien bij stappen waarbij minder dan 10 µl materiaal hoeft te worden toegevoegd aan elke monsterwell.

- Gebruik een pipet met fijne punt voor het overbrengen van gefragmenteerde gDNA-monsters van de ultrasonicorbuisjes naar de bibliotheekpreparatieplaat (LP).
- Combineer SUA1- en UMI-adapters niet met elkaar.
- Gebruik SUA1-adapters bij RNA-monsters.
- Gebruik UMI-adapters bij DNA-monsters.
- Wijs verschillende indexprimers toe aan elk bibliotheekmonster om elke bibliotheek uniek te identificeren wanneer deze wordt samengevoegd voor sequencing op een enkele stroomcel.
- Combineer CPxx- en UPxx-indexprimers niet met elkaar in dezelfde bibliotheek.
- Verkeerde combinaties tussen monsters en indexeringsprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportages vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie. Voordat u met de bibliotheekpreparatie begint, voert u de monster-ID's in en wijst u indexen toe in de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule. Registreer tijdens de bibliotheekpreparatie als referentie monster-ID's, indexeringen en de locatie van de wells op de plaat.
- Gebruik alleen UPxx-indexen voor bibliotheken die zijn afgeleid van RNA-monsters.
- Voor bibliotheken die zijn afgeleid van DNA-monsters gebruikt u UPxx- of CPxx-indexen.
- Voer op maximaal 8 RNA-bibliotheken en 8 DNA-bibliotheken per stroomcel sequencing uit. Voer op minimaal drie bibliotheken sequencing uit. Volg de richtlijnen in [Aantal bibliotheken en indexen selecteren op pagina 35](#).
- Ga na de bindingsstap in [Vastleggen doelen – één op pagina 60](#) en [Vastleggen doelen – twee op pagina 64](#) onmiddellijk door naar de wasstap om te voorkomen dat parelpellets opdrogen.
- Verwijder tijdens de stappen van het wassen alle 80% ethanol van de bodem van de wells. Het is aangetoond dat restant ethanol de resultaten beïnvloedt.
- Volg voor een optimale assayprestatie het gespecificeerde aantal wasbeurten dat wordt aangegeven in de [Gebruiksaanwijzing op pagina 39](#).
- Resuspendeer tijdens de procedure [Bibliotheken normaliseren op pagina 71](#) grondig het parelpellet van de bibliotheek om een consistente clusterdichtheid op de stroomcel te krijgen.
- Meld ernstige incidenten in verband met dit product onmiddellijk aan Illumina en de bevoegde autoriteiten van de lidstaten waar de gebruiker en de patiënt gevestigd zijn.

Procedurele opmerkingen

- De TSO Comprehensive (EU)-workflow kan worden uitgevoerd volgens het volgende schema:
 - Dag 1: Synthese van cDNA uit RNA-monsters, DNA-fragmentatie van gDNA-monsters, bibliotheekpreparatie en begin nachtelijke (eerste) hybridisatie.
 - Dag 2: Verrijking, normalisatie van verrijkte bibliotheken en laden van bibliotheken op het NextSeq 550Dx-instrument.

Als het niet mogelijk is de TSO Comprehensive (EU)-workflow volgens dit schema uit te voeren, zijn er gedurende het gehele protocol verschillende veilige stoppunten gespecificeerd. Tenzij er in het protocol een veilig stoppunt is aangegeven, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

- Bibliotheken afgeleid van RNA- en DNA-monsters kunnen gelijktijdig in afzonderlijke wells worden geprepareerd.
- Tabellen voor de bereiding van mastermengsels omvatten volumeoverschotten om er zeker van te zijn dat er voldoende volume is voor het aantal monsters dat wordt verwerkt.
- Gebruik water van moleculaire graad dat vrij is van nucleasen.
- Spoel na toevoeging van het reagens de tip af door één keer uit de betreffende well in de plaat te aspireren en terug te dispensereren, tenzij anders wordt gespecificeerd in de procedure.
- Kamertemperatuur wordt gedefinieerd als 15 °C tot 30 °C.
- Reagentia, monsters en bibliotheken moeten bij bepaalde stappen volgens de gebruiksaanwijzing koud worden bewaard. Dit wordt gedefinieerd als het op ijs of gelijkwaardig houden.

Thermocyclerprogramma's

- Programmeer thermocyclerprogramma's op apparatuur voor pre-amplificatie en post-amplificatie voordat u het protocol start.
- Zorg ervoor dat de PCR-platen goed in de thermocycler passen.
- Gebruik platen die worden aanbevolen door de fabrikant van de thermocycler.

Afdekfolie aanbrengen over en verwijderen van de plaat

- Dicht de platen altijd af met een nieuwe klevende plaatafdichting. Afdichtingen mogen niet worden hergebruikt.
- Breng de klevende afdekfolie aan op de plaat met een afsluitwig of sealroller om de plaat goed af te dichten.
- Dicht de 96-wells plaat altijd af met een nieuwe klevende plaatafdichting voordat u verder gaat naar de volgende stappen in het protocol.
 - Stappen voor het schudden van de plaat
 - Stappen voor centrifugeren
 - Stappen voor thermocycling
 - Hybridisaties
 - Langdurige opslag
- Zorg ervoor dat de randen en wells zijn afgedicht om het risico op kruisbesmetting en verdamping te verminderen.
- Plaats de plaat op een vlakke ondergrond alvorens de afdekfolie voorzichtig te verwijderen.
- Als er vloeistof of condensatie te zien is op de afdichting of zijwanden van de plaatwells, moet de plaat vóór het verwijderen van de folie gedurende 1 minuut worden gecentrifugeerd op 280 x g.

- Gebruik klevende plaatafdichtingen die effectief zijn bij -20 °C tot 100 °C en die geschikt zijn voor volledig of gedeeltelijk omrande PCR-platen.

Apparatuur

- Zorg ervoor dat de laboratoriummedewerkers bekend zijn met de instructies van de fabrikant voor het gebruik en onderhoud van alle apparatuur voordat wordt gestart met de assay.

Plaatype en plaatoverdrachten

- Het juiste plaatype is vereist voor optimale assayprestaties en opslag.
- Breng bij overdracht van volumes tussen platen het gespecificeerde volume over van elke well van een plaat naar de overeenkomende well van de bestemmingsplaat.
- Er kunnen meerkanaalse pipetten worden gebruikt bij het overbrengen van monsters tussen buisjesstrips of platen.
- Gebruik de volgende richtlijnen bij het schudden van platen.
 - Gebruik een plaatschudder om platen te schudden. Platen mogen niet worden gevortext.
 - Schud PCR-platen bij 1200 tpm.
 - Schud MIDI-platen bij 1800 tpm.
 - Volg de instructies van de fabrikant om er zeker van te zijn dat de plaat goed in de plaatschudder zit.

Centrifugeren

- Wanneer de instructies in het protocol aangeven dat er kort moet worden gecentrifugeerd, centrifugeer dan 1 minuut lang op 280 × g.
- Als er vloeistof wordt waargenomen op de afdichting of aan de zijkanten van een well, dan moet de plaat gedurende 1 minuut op 280 × g worden gecentrifugeerd.

Omgaan met reagentia

- Plaats de dop van reagensbuisjes er onmiddellijk na gebruik weer goed op om evaporatie te beperken en besmetting te voorkomen.
- Breng de reagentia terug naar de gespecificeerde opslagtemperatuur als ze niet langer nodig zijn voor een procedure.
- Volg de reagensbereiding die voorafgaat aan elke procedureparagraaf in de [Gebruiksaanwijzing op pagina 39](#).
- Zorg ervoor dat u de vereiste volumes mastermengsel, elutiemengsel en 80% ethanol bereidt voor het aantal monsters dat u gaat verwerken.
- De volumes in de tabellen voor mastermengsels en oplossingen bevatten overschotten. Berekeningen voor volumeoverschotten zijn als volgt.

- **Tabel 14**
 - Volume FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{aantal monsters} + \text{controles}) \times (1,25)$.
 - Volume RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{aantal monsters} + \text{controles}) \times (1,25)$.
- **Tabel 21**
 - Volume ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,20)$.
 - Volume ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,20)$.
- **Tabel 29**
 - Volume EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,364)$.
 - Volume HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,364)$.
- **Tabel 30**
 - Volume EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,364)$.
 - Volume HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,364)$.
- **Tabel 36**
 - Volume LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (2,0)$.
 - Volume LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (2,0)$.
- **Tabel 37**
 - Volume EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,25)$.
 - Volume HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{aantal bibliotheken}) \times (1,25)$.

Adaptersets

- Het TSO Comprehensive (EU)-assay omvat SUA1-adapters en UMI-adapters.
- SUA1-adapters zijn voor gebruik met RNA-monsters. Niet voor gebruik met DNA-monsters.
- UMI-adapters zijn voor gebruik met DNA-monsters. Niet voor gebruik met RNA-monsters.

Parels hanteren

- Er bevinden zich drie soorten parels in het TSO Comprehensive (EU)-assay (SPB, SMB en LNB1). Zorg ervoor dat het juiste pareltype wordt gebruikt tijdens de procedure.
- Voer het juiste aantal wassingen voor elk pareltype uit.
- Zorg ervoor dat de parels voor gebruik op kamertemperatuur zijn.
- Meng de parels 1 minuut voor gebruik om homogeniteit te garanderen.

- Gebruik de volgende richtlijnen bij het mengen van parels met een pipet:
 - Gebruik een geschikte pipet en tipgrootte voor het volume dat u mengt.
 - Pas de volume-instelling aan tot ongeveer 50–75% van het monstervolume.
 - Pipetteer langzaam zonder de plunjer los te laten.
 - Vermijd spatten en het introduceren van luchtbellens.
 - Positioneer de pipettip boven het pellet en dispenseer direct in het pellet om de parels uit de well of het buisje te halen.
 - Zorg ervoor dat het parelpellet volledig ondergedompeld is in de oplossing. De oplossing moet er donkerbruin uitzien en een homogene consistentie hebben.
 - Beoordeel of er een parelpellet aanwezig is. Zuig voorzichtig de totale pareloplossing van de well op in de tip en kijk naar de bodem van de wells.
- Als er tijdens de stappen voor magnetische scheiding parels in de pipettips worden opgezogen, dispenseer de parels dan terug op de plaatwell op de magnetische standaard. Wacht tot de vloeistof helder is (ongeveer 2 minuten) voordat u verdergaat met de volgende stap van de procedure.
- Bij het wassen van parels:
 - Gebruik de aanbevolen magnetische standaard voor de plaat.
 - Dispenseer vloeistof rechtstreeks op het parelpellet, zodat parels aan de zijkant van de wells ook nat worden.
 - Houd de plaat op de magnetische standaard totdat in de procedure wordt aangegeven dat deze moet worden verwijderd.
 - Beweeg de plaat niet terwijl deze op de magnetische standaard staat.
 - Verstoor het parelpellet niet terwijl het zich op de magnetische standaard bevindt.
- Breng de pipettips bij het wassen van parels of het verwijderen van supernatans in een hoek aan op de bodem van de wells om te voorkomen dat een vacuüm wordt gecreëerd en oplossing in de pipettipfilters wordt gezogen.

Aantal bibliotheken en indexen selecteren

Plan voorafgaand aan het instellen van de run het aantal monsterbibliotheken en monsterindexen voor de sequencing-run. De volgende richtlijnen voor monsteraantallen omvatten positieve controles, maar bevatten geen negatieve controles/amplificatiereagenscontroles (NTC, no-template controls). NTC's moeten als extra monster aan de geplande run worden toegevoegd.

Volg voor TSO Comprehensive (EU) de richtlijnen in [Tabel 6](#) en [Tabel 7](#) om het aantal RNA- en/of DNA-bibliotheken dat op één stroomcel wordt gesequencet te bepalen. Raadpleeg [Tabel 6](#) als u sequencing voor RNA- of DNA-bibliotheken afzonderlijk uitvoert. Raadpleeg [Tabel 7](#) als u sequencing voor RNA- en DNA-bibliotheken in dezelfde stroomcel uitvoert.

Tabel 6 Sequencing van RNA- of DNA-bibliotheken

Bibliotheektype	Minimum*	Maximum*
Alleen RNA	3	16
Alleen DNA	3	8

* NTC's dragen niet bij aan de plexiteit.

Tabel 7 Sequencing van RNA- en DNA-bibliotheken in dezelfde stroomcel

Bibliotheektype	Minimum*	Maximum*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC's dragen niet bij aan de plexiteit.

Voor optimaal reagensgebruik bij sequencing van DNA en RNA-bibliotheken met TSO Comprehensive (EU) op de NextSeq 550Dx-instrument, dient u sequencing van 8 RNA bibliotheken en 8 DNA-bibliotheken per stroomcel uit te voeren.

Indexprimers identificeren elk monster op unieke wijze, zodat bibliotheken met elkaar gepoold kunnen worden voor sequencen op één stroomcel. Compatibele indexcombinaties worden tijdens het instellen van de run op de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule weergegeven op het scherm 'Create Run' [Run aanmaken]. Voeg tijdens de bibliotheekpreparatie de indexprimer toe aan elke monsterbibliotheek. *Gebruik voor elke monsterbibliotheek een ander indexprimermengsel.*

Zorg ervoor dat de indexprimers die u met monsters gebruikt overeenkomen met de indexen die u selecteert voor analyse met de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule. *Verkeerde combinaties veroorzaken onjuiste resultaatrapportage vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie.*

Het TSO Comprehensive (EU)-assay bevat twee types indexen.

- **UPxx-indexen**—Gebruik UPxx-indexen voor bibliotheken die zijn afgeleid van RNA- of DNA-monsters.
- **CPxx-indexen**—Gebruik CPxx-indexen voor bibliotheken die zijn afgeleid van DNA-monsters. Gebruik geen CPxx-indexen voor bibliotheken die zijn afgeleid van RNA-monsters of als er in totaal slechts drie DNA-bibliotheken worden gesequencet.

Bij het sequencen van slechts drie bibliotheken zijn de volgende vereisten van toepassing:

- Bibliotheken moeten allemaal DNA of allemaal RNA zijn.
- Gebruik geen CPxx-indexsets.
- Een van de volgende UPxx-indexsets is vereist om voldoende diversiteit te leveren:
 - UP01, UP02 en UP03
 - UP04, UP05 en UP06
 - UP07, UP08 en UP09
 - UP10, UP11 en UP12

Bijvoorbeeld, de eerste bibliotheek wordt toegewezen aan UP01, de tweede bibliotheek aan UP02 en de derde bibliotheek aan UP03.

TruSight Oncology Controles

TSO Comprehensive (EU) vereist TruSight Oncology Controls, die bestaat uit de TruSight Oncology DNA-controle en de TruSight Oncology RNA-controle als positieve controles. Neem voor elke DNA-sequencing-run de TruSight Oncology DNA-controle en voor elke RNA-sequencing-run de TruSight Oncology RNA-controle op in een bepaalde bibliotheekpreparatie (neem ook controles op voor gecombineerde DNA- en RNA-runs). Voor elke geplande gesequente run wordt een unieke positieve controle voorbereid. Raadpleeg de Bijsluiter TruSight Oncology Controls (documentnr. 200009919) voor meer informatie.

De inpuhoeveelheid voor de positieve controle bedraagt 40 ng voor zowel DNA als RNA.

Neem de juiste NTC op in elke RNA- en DNA-bibliotheekbereiding. De NTC wordt herhaaldelijk gesequencet binnen één preparatie van een bibliotheek. Volg deze richtlijnen voor de TruSight Oncology Controls:

- Bereid bibliotheken van positieve controles en no-template controles op identieke wijze als monsters.
- Gebruik TEB voor de DNA NTC.
- Gebruik DNase/RNase-vrij water voor de RNA NTC.
- De positieve controles worden meegenomen in de maximale bibliotheekvereiste.
- De NTC's worden niet meegenomen in de minimale bibliotheekvereiste.
- Gebruik UP-indexen voor de NTC bij sequencing van slechts 3 bibliotheken.
- Als de NTC herhaaldelijk wordt gesequencet, kunnen de indexen die zijn geselecteerd voor deze controle niet worden herhaald in de bibliotheekpreparatiecyclus.

In de volgende tabellen staan voorbeelden van plaatlay-outs voor bibliotheekpreparatie. Elke genummerde kolom vertegenwoordigt één sequencing-run. Wanneer DNA- en RNA-bibliotheken samen gesequencet worden, staat elke overeenkomende set kolommen voor één sequencing-run (bijv. kolom 1 en kolom 7). De NTC wordt gesequencet voor elke kolom of set kolommen.

Tabel 8 Bibliotheekpreparatiecyclus van een enkele run met zes patiëntmonsters

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

Tabel 9 Bibliotheekpreparatiecyclus van drie runs met 20 patiëntmonsters

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

Gebruiksaanwijzing

Een overzicht van de TSO Comprehensive (EU)-workflow wordt getoond in [Afbeelding 1](#) en [Afbeelding 2](#).

Workflow voor bibliotheekpreparatie

[Afbeelding 1](#) toont de workflow voor preparatie van de bibliotheek voor de TSO Comprehensive (EU).

Bibliotheken van RNA- en DNA-monsters kunnen gelijktijdig in afzonderlijke wells worden geprepareerd.

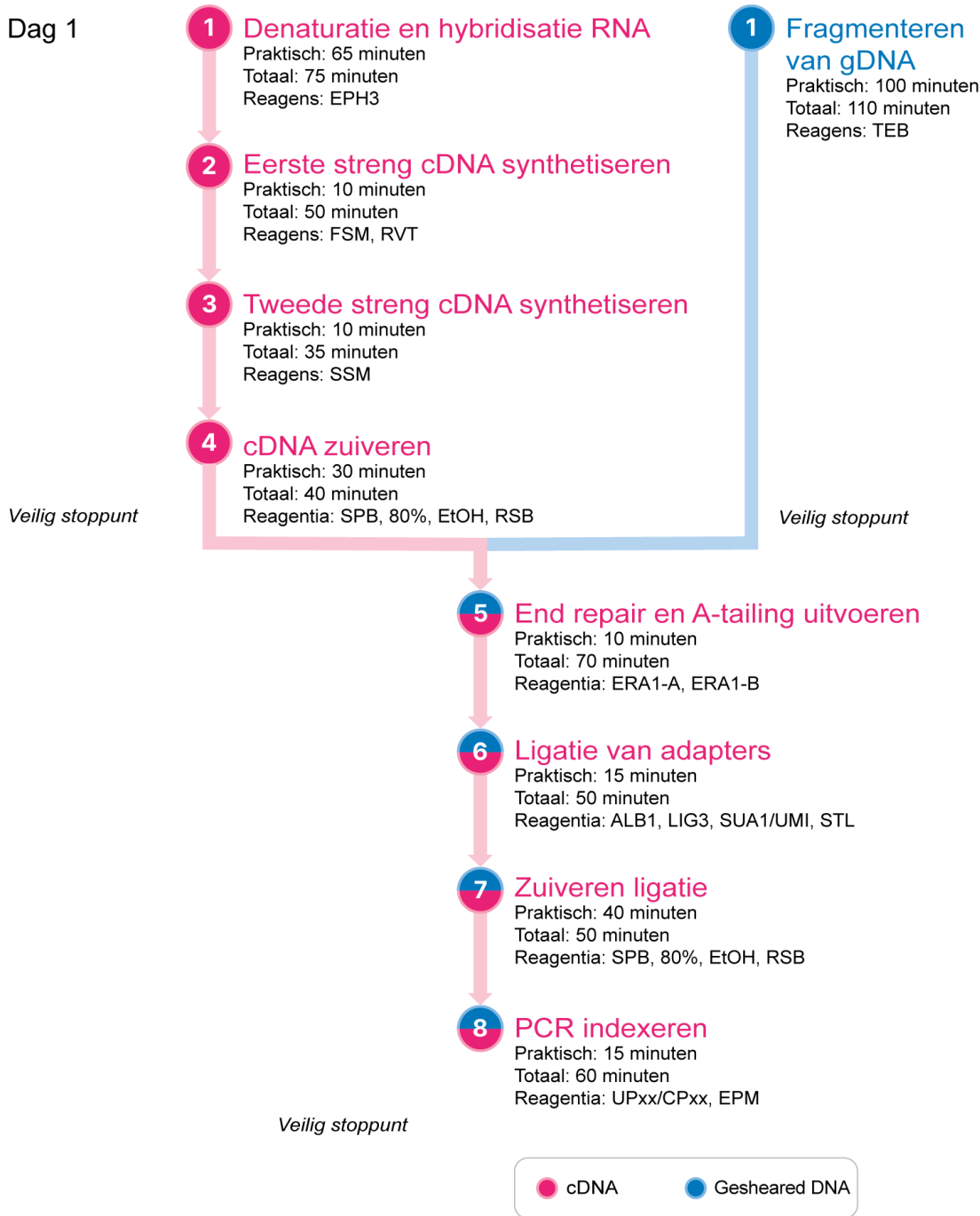
Positieve controles en amplificatiereagenscontroles worden op precies dezelfde manier verwerkt als monsters.

De veilige stoppunten zijn gemarkeerd tussen de stappen.

Voordat u het protocol start, voert u de gegevens van de run en het monster in op de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule. Raadpleeg de *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)*.

Afbeelding 1 TSO Comprehensive (EU) Workflow (deel 1)

Dag 1



* De praktische en totale tijdsduren zijn een schatting.

Workflow voor verrijking

Afbeelding 2 toont de workflow voor verrijking van de TSO Comprehensive (EU). De veilige stoppunten zijn gemarkeerd tussen de stappen.

Afbeelding 2 TSO Comprehensive (EU) Workflow (deel 2)



Thermocyclers programmeren

Sla voordat u begint met de assay de volgende programma's op thermocyclers voor pre-amplificatie en post-amplificatie op.

Tabel 10 Pre-amplificatieprogramma's voor de thermocycler

Procedurestap	Programma-naam	Deksel-temperatuur	Reactievolumen	Thermocycler-parameters
Denaturatie en hybridisatie RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C gedurende 5 minuten • 4 °C gedurende 1 minuut • Vasthouden op 4 °C
Eerste streng cDNA synthetiseren	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C gedurende 10 minuten • 42 °C gedurende 15 minuten • 70 °C gedurende 15 minuten • 4 °C gedurende 1 minuut • Vasthouden op 4 °C
Tweede streng cDNA synthetiseren	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C gedurende 25 minuten • 4 °C gedurende 1 minuut • Vasthouden op 4 °C

OPMERKING Als de dekseltemperatuur voor 2ndSS niet kan worden ingesteld op 30 °C, moet de optie voor voorverwarmd deksel worden uitgeschakeld.

Tabel 11 Post-amplificatieprogramma's voor de thermocycler

Procedurestap	Programma-naam	Deksel-temperatuur	Reactievolumen	Thermocycler-parameters
PCR indexeren	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C gedurende 30 seconden • 15 cycli van: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C gedurende 10 seconden • 60 °C gedurende 30 seconden • 72 °C gedurende 30 seconden • 72 °C gedurende 5 minuten • Vasthouden op 10 °C
Eerste hybridisatie uitvoeren	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C gedurende 10 minuten • 85 °C gedurende 2 min 30 seconden • 75 °C gedurende 2 min 30 seconden • 65 °C gedurende 2 min 30 seconden • 57 °C aanhouden gedurende 8 tot 24 uur

Procedurestap	Programma-naam	Deksel-temperatuur	Reactievolume	Thermocycler-parameters
Tweede hybridisatie uitvoeren	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C gedurende 10 minuten • 85 °C gedurende 2 min 30 seconden • 75 °C gedurende 2 min 30 seconden • 65 °C gedurende 2 min 30 seconden • 57 °C aanhouden gedurende 1,5 tot 4 uur
Verrijkte bibliotheek amplificeren	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C gedurende 30 s • 18 cycli van: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C gedurende 10 s • 60 °C gedurende 30 s • 72 °C gedurende 30 s • 72 °C gedurende 5 min • Vasthouden op 10 °C

Voorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren tot aan het eerstvolgende veilige stoppunt.



LET OP

Alle procedures in de workflow vereisen een RNase/DNase-vrije omgeving.

1. Ontsmet de werkgebieden grondig met een RNase/DNase-remmend reinigingsmiddel.
2. Zorg ervoor dat de thermocyclerprogramma's voor pre-amplificatie zijn ingesteld. Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
3. Volg de instructies van de fabrikant om de ultrasonicator in te stellen.
4. Ga bij het verwerken van alleen DNA-monsters direct verder naar [Fragmenteren van gDNA op pagina 49](#).
5. Haal de RNA-controles uit de opslag.
6. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (onderdeelnr. 20031127)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
EPH3	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Denaturatie en hybridisatie RNA
FSM	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste streng cDNA synthetiseren
RVT	-25 °C tot -15 °C	Houd het koud.	Eerste streng cDNA synthetiseren

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SSM	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede streng cDNA synthetiseren

Tabel 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	cDNA zuiveren
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	cDNA zuiveren

Denaturatie en hybridisatie RNA

Bij dit proces wordt gezuiverd RNA gedenatureerd en geprimed met willekeurige hexameren in voorbereiding op cDNA-synthese.

Vorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
 - EPH3—Zet opzij.
 - FSM—Vortex om te mengen. Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Het reagens kan witte, productgerelateerde deeltjes bevatten. Er is geen actie van de gebruiker vereist. Er is geen invloed op de prestaties van het product.
 - RVT—Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Houd het koud.

OPMERKING RVT is een viskeuze oplossing. Minimaliseer de vorming van luchtballen tijdens het pipetteren.

2. Combineer de volgende volumes in een microcentrifugebuisje om een FSM + RVT-mastermengsel te bereiden.

Tabel 14 FSM+RVT-mastermengsel*

Mastermengsel-component	4 bibliotheeken (µl)	8 bibliotheeken (µl)	16 bibliotheeken (µl)	24 bibliotheeken (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg [Omgaan met reagentia op pagina 33](#) voor berekeningen.

3. Pipetteer 10 keer om te mengen.
4. Houd het FSM + RVT-mastermengsel koud tot [Eerste streng cDNA synthetiseren op pagina 45](#).

Procedure

1. Houd geëxtraheerde RNA-monsters en RNA-controles koud tijdens het ontdooien.
Verwerk de RNA-controles als monsters voor de rest van het protocol.
2. Houd RNA koud wanneer het niet in gebruik is. Raadpleeg [Monstervereisten op pagina 26](#) om monsters te kwantificeren.
3. Pipetteer elk RNA-monster 10 keer om te mengen.
4. Gebruik RNase/DNase-free water om 40 ng van elk RNA-monster te bereiden tot een eindvolume van 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Gebruik voor RNA-controles de concentratie die op het label van het buisje staat vermeld.
5. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'CF' ('cDNA Fragments', cDNA-fragmenten).
6. Voeg 8,5 µl van elk RNA-monster toe aan een unieke well van de CF PCR-plaat.
7. Zorg ervoor dat tijdens het instellen van de run de lay-out van de monsterplaat en de indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland in de Analysemodule voor TSO Comprehensive (EU).
8. Vortex EPH3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Voeg 8,5 µl EPH3 toe aan elke monsterwell.
10. Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR-plaat.



LET OP

Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.

11. Schud gedurende 1 minuut bij 1200 tpm.
12. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
13. Zet op de thermocycler en voer het programma LQ-RNA uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
14. Wanneer de monsters 4 °C bereiken, houd dit dan gedurende 1 minuut vast. Ga direct door naar de volgende stap.

Eerste streng cDNA synthetiseren

Bij dit proces worden de RNA-fragmenten die zijn geprimed met willekeurige hexameren omgezet in de eerste streng cDNA aan de hand van reverse transcriptase.

Procedure

1. Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Pipetteer tien keer om het FSM+RVT-mastermengsel te mengen. Zorg ervoor dat het FSM+RVT-mengsel volledig homogeen is.
3. Voeg 8 µl FSM+RVT-mastermengsel toe aan elke monsterwell.
4. Pipetteer 10 keer om te mengen.

5. Gooi resterend FSM+RVT-mastermengsel weg.
6. Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
7. Schud gedurende 1 minuut bij 1200 tpm.
8. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
9. Zet op een thermocycler en voer het programma 1stSS uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
10. Wanneer de monsters 4 °C bereiken, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.
De monsters van de eerste streng kunnen maximaal 5 minuten worden bewaard bij 4 °C.

Tweede streng cDNA synthetiseren

Bij dit proces wordt het RNA-sjabloon verwijderd en het dubbelstrengse cDNA gesynthetiseerd.

Vorbereiden

1. SSM voorbereiden:
 - a. Keer 10 keer om om te mengen.
 - b. Centrifugeer kort. Het reagens kan witte, productgerelateerde deeltjes bevatten. Er is geen actie vereist. Er is geen invloed op de prestaties van het product.

Procedure

1. Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Voeg 25 µl SSM toe aan elke monsterwell.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
4. Schud gedurende 1 minuut bij 1200 tpm.
5. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
6. Plaats op een thermocycler en voer het 2ndSS-programma uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
7. Wanneer het monster 4 °C bereikt, dit 1 minuut vasthouden en vervolgens onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

cDNA zuiveren

Bij dit proces wordt gebruikgemaakt van SPB om de cDNA te zuiveren van ongewenste reactiecomponenten. De parels worden tweemaal gewassen met verse 80% EtOH. De cDNA wordt geëluëerd met RSB.

Vorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
 - SPB—Zorg ervoor dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
 - RSB—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Bereid verse 80% EtOH in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml als volgt.

Tabel 15 Bereid vers 80% EtOH voor

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

3. Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
4. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat als 'BIND1' (cDNA-binding).
5. Dek af en zet opzij.
6. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
3. Voeg onmiddellijk 90 µl SPB toe aan elke monsterwell van de BIND1 MIDI-plaat.
Als een bak wordt gebruikt om SPB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,15 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat er SPB is toegevoegd aan elke monsterwell.
4. Breng het volledige volume (50 µl) van elk monster over van de CF PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BIND1 MIDI-plaat.
5. Gooi de lege CF PCR-plaat weg.
6. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND1 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
7. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
8. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
9. Plaats de BIND1 MIDI-plaat gedurende 5 minuten op een magnetische standaard.
10. Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke monsterwell te verwijderen en weg te gooien.

Wassen

1. Was de parels als volgt.
 - a. Houd de BIND1 MIDI-plaat op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke well.
 - b. Wacht 30 seconden.
 - c. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke monsterwell te verwijderen en weg te gooien.
2. Was de parels een **tweede** keer.
3. Gebruik een pipet met fijne uiteinden om overgebleven EtOH uit elke well te verwijderen.
4. Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

1. Verwijder de BIND1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
3. Voeg 22 µl RSB toe aan elke monsterwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND1 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
6. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'PCF' ('Purified cDNA Fragments', gezuiverde cDNA-fragmenten). Gebruik een PCR-plaat als u stopt bij het [VEILIG STOPPUNT op pagina 48](#).
9. Breng 20 µl eluaat over van elke monsterwell van de BIND1 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de PCF-plaat.
10. Gooi de lege BIND1 MIDI-plaat weg.
11. Voeg 30 µl RSB toe aan elke monsterwell van de PCF-plaat.
12. Pipetteer 10 keer om te mengen.
13. Breng een zelfklevende plaatafdichting aan op de PCF-plaat en houd deze koud.
14. Breng de EPH3, FSM, RVT en SSM terug naar de opslag.
15. Als u alleen monsters verwerkt die zijn afgeleid van RNA (cDNA) en niet stopt bij het veilige stoppunt, ga dan door naar [End Repair en A-tailing uitvoeren op pagina 52](#).

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de PCF PCR-plaat gedurende 1 minuut centrifugeren op 280 × g en gedurende maximaal 7 dagen bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Vorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren tot aan het eerstvolgende veilige stoppunt.

1. Haal de DNA-controles uit de opslag.
2. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TEB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Fragmenteren van gDNA

Fragmenteren van gDNA

Bij dit proces worden gDNA gefragmenteerd en dsDNA-fragmenten gegenereerd met 3' of 5' overhang.

Vorbereiden

1. Volg de aanbevelingen in [Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27](#) om monsters te kwantificeren.
2. Bereid TEB voor en meng door te inverteren of te vortexen.

Procedure

De plaat voorbereiden

Selecteer een van de volgende opties om de plaat voor te bereiden:

- Verwerk gDNA-monsters tegelijkertijd met cDNA-monsters in de PCF MIDI-plaat.
 - a. Label de PCF MIDI-plaat met LP (bibliotheekpreparatie).
 - b. Dek af en zet opzij voor gebruik bij [Gefragmenteerd DNA overbrengen op pagina 50](#).
- Verwerk gDNA-monsters tegelijkertijd met cDNA-monsters en de PCF PCR-plaat is bevroren.
 - a. Ontdooi de PCF PCR-plaat tot kamertemperatuur.
 - b. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
 - c. Pipetteer 10 keer om te mengen.
 - d. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP' (bibliotheekpreparatie).
 - e. Breng de volledige hoeveelheid van 50 µl van elk monster over van de PCF PCR-plaat naar de overeenkomende well van de LP MIDI-plaat.
 - f. Gooi de PCF PCR-plaat weg.
 - g. Breng de kleefplaatafdichting aan en houd deze koud tot [Gefragmenteerd DNA overbrengen op pagina 50](#).

- Verwerk alleen gDNA-monsters.
 - a. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP' (bibliotheekpreparatie).
Gebruik een PCR-plaat als u stopt bij het [VEILIG STOPPUNT op pagina 51](#).
 - b. Dek af en zet opzij voor gebruik in [Gefragmenteerd DNA overbrengen op pagina 50](#).

gDNA verdunnen

1. Ontdooi de gDNA-monsters en DNA-controles bij kamertemperatuur.
2. Pipetteer elk gDNA-monster 10 keer om te mengen.
3. Centrifugeer het buisje kort om druppels te verzamelen.
4. Inverteer of vortex de TEB om te mengen.
5. Gebruik TEB om elk gDNA-monster voor te bereiden in een eindvolume van 52 µl. Raadpleeg de volgende tabel voor invoerhoeveelheden en minimale concentraties op basis van het monstertype.
 - Het assay vereist een minimale extractieconcentratie om minimaal 40 µl TEB van het volume van 52 µl mogelijk te maken.
 - Gebruik voor DNA-controles de concentratie die op het label van het buisje staat vermeld.
 - Om monsterverlies te voorkomen, dient u niet minder dan 2 µl monster in deze verdunning te pipetteren.

Monstertype	Invoerhoeveelheid (ng)	Minimale concentratie (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Control	40	Zie het etiket van het buisje

Fragmenteren

1. Voeg 52 µl van elk gDNA-monster toe aan een afzonderlijke well van het ultrasonicatorbuisje.



LET OP

Plaats het gDNA langzaam in het buisje en zorg er daarbij voor dat er aan de onderkant van het buisje geen luchtholtes zijn. Raadpleeg voor meer informatie [Assay op pagina 29](#) en de instructies van de fabrikant.

2. Noteer de oriëntatie van de strip.
3. Fragmenteer het gDNA met de ultrasonicator tot fragmenten.

Gefragmenteerd DNA overbrengen

1. Zorg ervoor dat de lay-out van de monsterplaat en de indexen voor elk monster overeenkomen met de run die u selecteert voor analyse met de Analysemodule voor TSO Comprehensive (EU).
2. Volg de instructies van de fabrikant van de ultrasonicator om het monster te herstellen.
Bij sommige buistypes voor de ultrasonicator is centrifugeren nodig om het monster in het buisje te consolideren.

3. Gebruik bij elk gefragmenteerd gDNA-monster een pipet met fijne uiteinden om drie overdrachten van 16,7 µl naar een lege well van de LP MIDI-plaat uit te voeren.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP MIDI-plaat.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u een klevende plaatafdichting aanbrengen op de LP PCR-plaat en deze gedurende 1 minuut centrifugeren op 280 × g. Gedurende maximaal 7 dagen bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Voorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren tot aan het eerstvolgende veilige stoppunt.

Zorg ervoor dat de thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie zijn ingesteld. Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).

1. Zet een ijsemmer of iets dergelijks klaar.
2. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (onderdeelnr. 20031118)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
ERA1-A	-25 °C tot -15 °C	Houd het koud.	End Repair en A-tailing uitvoeren
ERA1-B	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	End Repair en A-tailing uitvoeren
ALB1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
LIG3	-25 °C tot -15 °C	Houd het koud.	Ligatie van adapters
SUA1 (blauwe dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
UMI (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
STL	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
EPM	-25 °C tot -15 °C	Houd het koud.	PCR indexeren

Tabel 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Zuiveren ligatie
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Zuiveren ligatie

Tabel 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (onderdeelnr. 20031120)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
UPxx	-25 °C tot -15 °C	Ontdooi de betreffende indexprimerbuisjes tot kamertemperatuur.	PCR indexeren

Tabel 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (onderdeelnr. 20031126)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
CPxx	-25 °C tot -15 °C	Ontdooi de betreffende indexprimerbuisjes tot kamertemperatuur.	PCR indexeren

End Repair en A-tailing uitvoeren

Dit proces repareert de overhangende uiteinden resulterend van fragmentatie tot uiteinden met overhangende A-tail door middel van een End Repair A-Tailing-mastermengsel (ERA1).

De 3' tot 5' exonucleaseactiviteit van dit mengsel verwijdert de overhangende uiteinden van 3' en de 5' tot 3' polymerase-activiteit vult de overhangende uiteinden van 5' in. De 3' uiteinden zijn tijdens deze reactie ge-A-tailed om te voorkomen dat ze aan elkaar ligeren tijdens de adapterligatiereactie.

Voorbereiden

- Verwarm als volgt 2 micromonsterincubators voor met MIDI-verwarmingsblokinzetten.
 - Verwarm een micromonsterincubator voor tot 30 °C.
 - Verwarm een micromonsterincubator voor tot 72 °C.
- Prepareer de volgende reagentia.
 - ERA1-A—Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Houd het koud.
 - ERA1-B—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
Inspecteer op bezinksel. Verwarm het buisje, indien aanwezig, tot 37 °C en daarna pipetteren om te mengen tot het bezinksel is opgelost.
- Bereid een ERA1-mastermengsel voor in een microcentrifugebuisje.

Tabel 21 ERA1-mastermengsel*

Mastermengsel-component	4 biblio- theken	8 biblio- theken	16 biblio- theken	24 biblio- theken	48 biblio- theken
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

* Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg [Omgaan met reagentia op pagina 33](#) voor berekeningen.

4. Pipetteer 10 keer langzaam om de homogeniteit te garanderen en centrifugeer vervolgens kort. Houd het ERA1-mastermengsel koud.
5. Selecteer een van de volgende opties om de plaat voor te bereiden:
 - Als de monsters zich in een MIDI-plaat bevinden, bereidt u deze als volgt voor.
 - a. Label de MIDI-plaat opnieuw, nu met 'LP2' (bibliotheekpreparatie 2).
 - b. Wanneer sommige monsters zich in afzonderlijke MIDI-platen bevinden, moeten alle monsters naar afzonderlijke wells van dezelfde MIDI-plaat worden overgebracht volgens de lay-out van de plaat.
 - Als de plaat bevroren is, bereidt u deze als volgt voor.
 - a. Ontdooi de PCF PCR-plaat of de LP PCR-plaat tot kamertemperatuur.
 - b. Centrifugeer de plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
 - c. Pipetteer 10 keer om te mengen.
 - d. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP2' (bibliotheekpreparatie 2).
 - e. Breng de volledige hoeveelheid van 50 µl van elk monster over van de PCF PCR-plaat of de LP PCR-plaat naar de overeenkomende well van de LP2 MIDI-plaat.
 - f. Gooi de PCF PCR- of de LP PCR-plaat weg.

Procedure

1. Voeg 10 µl ERA1-mastermengsel toe aan elke monsterwell in de LP2 MIDI-plaat.
2. Gooi resterend ERA1-mastermengsel weg.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
4. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
5. Incubeer in de voorverwarmde micromonsterincubator bij 30 °C gedurende 30 minuten.
6. Breng onmiddellijk over naar een tweede, voorverwarmde incubator voor micromonsters.
7. Incubeer gedurende 20 minuten bij 72 °C.
8. Houd de LP2 MIDI-plaat koud gedurende 5 minuten.

Ligatie van adapters

In dit proces worden adapters geligeerd aan de uiteinden van de cDNA- en/of gDNA-fragmenten. Het TSO Comprehensive (EU)-assay omvat SUA1-adapters en UMI-adapters.

- Gebruik SUA1-adapters bij RNA-monsters.
- Gebruik UMI-adapters bij DNA-monsters.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.

- ALB1—Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- LIG3—Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Houd het koud.
- SUA1—Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- UMI—Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- STL—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.

Procedure

1. Haal de LP2 MIDI-plaat van het ijs of iets vergelijkbaars.
2. Voeg 60 µl ALB1 toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat. ALB1 is een viskeuze oplossing. Pipetteer langzaam om de vorming van luchtbelletjes tot een minimum te beperken.
3. Voeg 5 µl LIG3 toe aan elke monsterwell.
4. Voeg de adapters toe als volgt.
Verschillende soorten adapters *niet* met elkaar combineren.
 - [RNA-monsterwells]—Voeg 10 µl SUA1 (blauwe dop) toe aan elk monster afgeleid van RNA.
 - [DNA-monsterwells]—Voeg 10 µl UMI (witte dop) toe aan elk monster afgeleid van DNA.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
7. Incubeer gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.
8. Vortex de STL om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Voeg 5 µl STL toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat.
10. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
11. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.

Zuiveren ligatie

Bij dit proces wordt SPB gebruikt om de adaptergeligeerde cDNA- of gDNA-fragmenten te zuiveren en worden ongewenste producten verwijderd. De parels worden tweemaal gewassen met verse 80% ethanol. De adaptergeligeerde monsters worden geëluëerd met RSB.

Vorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
 - SPB—Zorg ervoor dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
 - RSB—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Bereid verse 80% EtOH in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

Tabel 22 Bereid verse 80% ethanol voor

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

- Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
- Pak de magneet.

Procedure

Binden

- Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
- Voeg onmiddellijk 112 µl SPB toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat.
Als een bak wordt gebruikt om SPB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,15 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat er SPB is toegevoegd aan elke monsterwell.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
- Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
- Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
- Plaats de LP2 MIDI-plaat gedurende 10 minuten op de magnetische standaard.
- Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke monsterwell te verwijderen en weg te gooien.

Wassen

- Was de parels als volgt.
 - Houd de LP2 MIDI-plaat op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke monsterwell.
 - Wacht 30 seconden.
 - Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke monsterwell te verwijderen en weg te gooien.
- Was de parels een **tweede** keer.
- Gebruik een pipet met fijne uiteinden om overgebleven EtOH uit elke well te verwijderen.
- Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

- Verwijder de LP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.

2. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
3. Voeg 27,5 µl RSB toe aan elke monsterwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
6. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
7. Plaats de LP2 MIDI-plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe PCR-plaat met 96 wells met 'LS' (bibliotheekmonsters).
9. Breng 25 µl van elk eluaat over van de LP2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de LS PCR-plaat.
10. Gooi de lege LP2 MIDI-plaat weg.

PCR indexeren

Bij deze stap worden de bibliotheekfragmenten geamplificeerd met primers die indexsequenties toevoegen voor multiplexing van monsters. Het resulterende product bevat de volledige bibliotheek van cDNA en/of DNA-fragmenten, geflankeerd door adapters die vereist zijn voor de generatie van clusters.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
 - EPM—Houd het koud.
 - UPxx—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. UPxx is de indexprimer die tijdens het instellen van de run is geselecteerd op het scherm 'Create Run' [Run aanmaken] in de Local Run Manager-software.
 - CPxx—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. CPxx is de indexprimer die tijdens het instellen van de run is geselecteerd op het scherm 'Create Run' [Run aanmaken] in de Local Run Manager-software.
2. Zorg ervoor dat tijdens het instellen van de run de indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland in de Analysemodule voor TSO Comprehensive (EU). Zorg ervoor dat u de instructies voor indexselectie in [Aantal bibliotheken en indexen selecteren op pagina 35](#) volgt.



LET OP

Verkeerde combinaties tussen monsters en indexeringsprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportages vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie.

Procedure

1. Voeg 5 µl van de geschikte indexprimer (UPxx of CPxx) toe aan de overeenkomende monsterwell in de LS PCR-plaat in overeenstemming met de indexen die zijn geselecteerd.

**LET OP**

Hanteer en open slechts één indexprimerbuisje per keer. Plaats na gebruik onmiddellijk een nieuwe dop op elk indexbuisje. Combineer indexprimers niet met elkaar.

2. Vortex de EPM 5 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg 20 µl EPM toe aan elke monsterwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de LS PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
5. Schud gedurende 1 minuut bij 1200 tpm.
6. Breng de pre-amplificatiereagentia terug naar de opslag.

**LET OP**

Voer alle daaropvolgende stappen uit in een post-amplificatiezone om overdracht van amplificatieproduct te voorkomen.

7. Centrifugeer de LS PCR-plaat gedurende 1 minuut op 280 × g.
8. Plaats op de voorgeprogrammeerde post-amplificatiethermocycler en voer het I-PCR-programma uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
Als u verder gaat met [Eerste hybridisatie voorbereiden op pagina 58](#), volg dan de instructies voor het ontdoeien van reagentia in 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.
9. Centrifugeer na voltooiing van het I-PCR-programma de LS PCR-plaat gedurende 1 minuut op 280 × g.
10. Label de plaat opnieuw, nu met 'ALS' (geamplificeerde bibliotheekmonsters).

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de ALS PCR-plaat gedurende maximaal 30 dagen bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Vorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren voorafgaand aan de nachtelijke hybridisatie.

1. Zorg ervoor dat de thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie zijn ingesteld. Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
2. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TCB1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Tabel 24 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TCA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Tabel 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (onderdeelnr. 20031122)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
OPR1 (rode dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden
OPD2 (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Eerste hybridisatie voorbereiden

Tijdens dit proces wordt een pool oligo's gehybridiseerd tot cDNA-bibliotheken en wordt een pool oligo's gehybridiseerd tot gDNA-bibliotheken die zijn geprepareerd in de [PCR indexeren op pagina 56](#). Verrijking van doelgebieden vereist twee hybridisatiestappen. Bij de eerste hybridisatie worden oligo's gedurende de nacht (8–24 uur) gehybridiseerd tot cDNA- en/of gDNA-bibliotheken.

Vorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
 - TCB1—Verwarm het buisje 5 minuten lang op 37 °C. Vortex 10 seconden lang om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - TCA1—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - OPR1—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - OPD2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

- Als de ALS PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 × g. Pipetteren om te mengen.
- Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'HYB1' (Hybridisatie 1).

Procedure

- Breng 20 µl van elke cDNA- en/of gDNA-bibliotheek over van de ALS PCR-plaat naar de overeenkomende well van de HYB1 PCR-plaat.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de ALS PCR-plaat en leg deze opzij. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- Inspecteer de TCB1 op bezinksel. Warm het buisje, indien aanwezig, opnieuw op en vortex het buisje tot de kristallen zijn opgelost.
- Voeg 15 µl TCB1 toe aan elke bibliotheekwell in de HYB1 PCR-plaat.
- Voeg 10 µl TCA1 toe aan elke bibliotheekwell in de HYB1 PCR-plaat.
- Voeg de probes toe.
Verschillende soorten probes *niet* met elkaar combineren. Voeg slechts één probeset per well toe.
 - [RNA-bibliotheekwells]**—Voeg 5 µl OPR1 (rode dop) toe aan elke van RNA afgeleide bibliotheek.
 - [DNA-bibliotheekwells]**—Voeg 5 µl OPD2 (witte dop) toe aan elke van DNA afgeleide bibliotheek.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de HYB1 PCR-plaat. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- Plaats op de thermocycler en voer het HYB1-programma uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
- Hybridiseer bij 57 °C gedurende minimaal 8 uur tot maximaal 24 uur.
- Breng de hybridisatiereagentia terug naar de opslag.
- Bewaar de ALS PCR-plaat gedurende maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.

Voorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren tot aan het eerstvolgende veilige stoppunt.

Verwijder aan het begin van dag 2 de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SMB (donkerblauw label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Vastleggen doelen – één Vastleggen doelen – twee

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
ET2	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vastleggen doelen – één Vastleggen doelen – twee
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vastleggen doelen – één Vastleggen doelen – twee Bibliotheken normaliseren
TCB1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vastleggen doelen – twee Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren

Tabel 27 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
EE2	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Vastleggen doelen – één Vastleggen doelen – twee Bibliotheken normaliseren
EEW	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Vastleggen doelen – één
TCA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden

Tabel 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (onderdeelnr. 20031122)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
OPR1 (rode dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden
OPD2 (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden

Vastleggen doelen – één

Bij deze stap wordt gebruikgemaakt van SMB voor het vastleggen van probes die zijn gehybridiseerd op de doelgebieden van belang. De parels worden driemaal gewassen met EEW. De verrijkte bibliotheken worden geëluëerd met vers EE2+HP3-elutiemengsel en geneutraliseerd met ET2.

Voorbereiden

1. Verwarm een micromonsterincubator met MIDI-verwarmingsblokinzet voor tot 57 °C.
2. Prepareer de volgende reagentia.
 - EEW—Vortex om te mengen gedurende 1 minuut.
 - EE2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

- HP3—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - SMB—Zorg ervoor dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn. Zorg ervoor dat u voor deze procedure **SMB** gebruikt, niet SPB.
 - ET2—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
3. Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel voor in een microcentrifugebuisje.

Tabel 29 EE2+HP3-elutiemengsel voor vastleggen doelen één*

Elutiemengsel-component	4 bibliotheeken	8 bibliotheeken	16 bibliotheeken	24 bibliotheeken	48 bibliotheeken
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg [Omgaan met reagentia op pagina 33](#) voor berekeningen.

4. Vortex het EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap [Elueren op pagina 62](#).
5. Label een nieuwe MIDI-plaat van 96 wells met CAP1 (vastleggen 1).
6. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de HYB1 PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Centrifugeer de HYB1 PCR-plaat gedurende 1 minuut op 280 × g.
3. Vortex de SMB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
Als er neerslag of een parelpetlet aanwezig is, breng dan het mengsel eerst op kamertemperatuur. Pipetteer vervolgens voorzichtig op en neer om de pellet los te maken en vortex het daarna om de suspensie opnieuw te herstellen.
4. Voeg onmiddellijk 150 µl SMB toe aan elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat.
Als u een bak gebruikt om SMB te doseren, neem dan een overschrijdingsfactor van 1,15 op bij het aliquoteren, zodat er voldoende materiaal per monster is.
5. Na het toevoegen van SMB aan elke monsterwell gooit u eventueel resterend materiaal weg.
6. Stel de pipet in op 50 µl en breng het volledige volume van elke bibliotheek over van de HYB1 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de CAP1 MIDI-plaat.
7. Gooi de lege HYB1 PCR-plaat weg.
8. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
9. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
10. Incubeer in de voorverwarmde micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 25 minuten.

11. Plaats de CAP1 MIDI-plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
12. Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.

**LET OP**

Ga direct door naar de volgende stap ([Wassen op pagina 62](#)). Laat het parelpetlet niet al te lange tijd zitten zonder dat er vloeistof aanwezig is.

Wassen

1. Was de parels als volgt.
 - a. Verwijder de CAP1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
 - b. Voeg 200 µl EEW toe aan elke well.
 - c. Gebruik een pipet die is ingesteld op 150 µl en pipetteer minimaal 10 keer om te mengen. Zorg ervoor dat alle parels geresuspendeerd zijn.

Zorg ervoor dat er geen parelpetlets aanwezig zijn door de totale pareloplossing voorzichtig uit de well in de tip op te zuigen. Inspecteer de bodem van elke well visueel. Als er een parelpetlet aanwezig is, kantel de pipetpunt tijdens de stappen van het wassen dan in de richting van de pellet om de pellet los te maken. Zorg ervoor dat de parelpetlet volledig in de oplossing is ondergedompeld. De oplossing moet er donkerbruin uitzien met een homogene consistentie.
 - d. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.
 - e. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
 - f. Schud bij 1800 tpm gedurende 4 minuten.
 - g. Incubeer in een micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 5 minuten.
 - h. Plaats de CAP1 MIDI-plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
 - i. Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.
2. Was de parels een **tweede** keer.
3. Was de parels een **derde** keer.
4. Gebruik een pipet met fijne uiteinden om overgebleven EEW uit elke well te verwijderen.

Elueren

1. Verwijder de CAP1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg voorzichtig 17 µl EE2+HP3-elutiemengsel toe aan elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat.
4. Gooi resterend EE2+HP3-elutiemengsel weg.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.

Dicht de randen en wells volledig af.

- Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
- Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'ELU1' (Elutie 1).
- Vortex de ET2 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- Voeg 5 µl ET2 toe aan elke overeenkomende bibliotheekwell in de nieuwe ELU1 PCR-plaat.
- Breng voorzichtig 15 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de ELU1 PCR-plaat.
- Gooi de lege CAP1 MIDI-plaat weg.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU1 PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- Breng de EEW terug naar de opslag.

Tweede hybridisatie voorbereiden

Bij deze stap worden doelgebieden van de verrijkte cDNA- en/of gDNA-bibliotheken voor de tweede keer gebonden aan afvangprobes. De tweede hybridisatie garandeert een hoge specificiteit van de vastgelegde gebieden. Voer om een optimale verrijking van bibliotheken te garanderen de tweede hybridisatiestap uit bij 57 °C gedurende minimaal 1,5 uur tot maximaal 4 uur.

Vorbereiden

- Prepareer de volgende reagentia.
 - TCB1—Verwarm het buisje 5 minuten lang op 37 °C. Vortex 10 seconden lang om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - TCA1—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - OPR1—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - OPD2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Procedure

- Inspecteer de TCB1 op bezinksel. Warm het buisje, indien aanwezig, opnieuw op en vortex het tot de kristallen zijn opgelost.
- Voeg 15 µl TCB1 toe aan elke bibliotheekwell in de ELU1 PCR-plaat.
- Voeg 10 µl TCA1 toe aan elke bibliotheekwell.
- Voeg dezelfde probe die tijdens de eerste hybridisatie werd gebruikt toe aan elke well. Voeg slechts één probeset per well toe.
Verschillende soorten probes *niet* met elkaar combineren.
 - [RNA-bibliotheekwells]**—Voeg 5 µl OPR1 (rode dop) toe aan elke van RNA afgeleide bibliotheek.

- **[DNA-bibliotheekwells]**—Voeg 5 µl OPD2 (witte dop) toe aan elke van DNA afgeleide bibliotheek.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU1 PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
 6. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
 7. Plaats op een thermocycler en voer het HYB2-programma uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
 8. Hybridiseer bij 57 °C gedurende minimaal 1,5 uur tot maximaal 4 uur.
 9. Breng de hybridisatiereagentia terug naar de opslag.

Vastleggen doelen – twee

Bij deze stap wordt gebruikgemaakt van SMB voor het vastleggen van probes die zijn gehybridiseerd op de doelgebieden van belang. De parels worden eenmaal gewassen met RSB. De verrijkte bibliotheken worden geëluëerd met vers EE2+HP3-elutiemengsel en geneutraliseerd met ET2.

Vorbereiden

1. Verwarm een micromonsterincubator met MIDI-verwarmingsblokinzet voor tot 57 °C.
2. Prepareer de volgende reagentia.
 - EE2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - HP3—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - SMB—Zorg ervoor dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
Zorg ervoor dat u voor deze procedure **SMB** gebruikt, niet SPB.
 - RSB—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
 - ET2—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
3. Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel voor in een microcentrifugebuisje.

Tabel 30 EE2+HP3-elutiemengsel voor vastleggen doel twee*

Elutiemengsel- component	4 biblio- theken	8 biblio- theken	16 biblio- theken	24 biblio- theken	48 biblio- theken
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg [Omgaan met reagentia op pagina 33](#) voor berekeningen.

4. Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap [Elueren op pagina 66](#).
5. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'CAP2' (vastleggen 2).
6. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de ELU1 PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Centrifugeer de ELU1 PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
3. Vortex de SMB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
Als er neerslag of een parelpetlet aanwezig is, breng dan het mengsel eerst op kamertemperatuur. Pipetteer vervolgens voorzichtig op en neer om de pellet los te maken en vortex het daarna om de suspensie opnieuw te herstellen.
4. Voeg onmiddellijk 150 µl SMB toe aan elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat.
Als u een bak gebruikt om SMB te doseren, neem dan een overschrijdingsfactor van 1,15 op bij het aliquoteren, zodat er voldoende materiaal per monster is.
5. Na het toevoegen van SMB aan elke monsterwell gooit u eventueel resterend materiaal weg.
6. Stel de pipet in op 50 µl en breng het volledige volume van elke bibliotheek over van de ELU1 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de CAP2 MIDI-plaat.
7. Gooi de lege ELU1 PCR-plaat weg.
8. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
9. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
10. Incubeer in een micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 25 minuten.
Als u verder gaat met [Verrijkte bibliotheek amplificeren op pagina 68](#), volg dan de instructies voor reagentia in de paragraaf [Voorbereiden op protocol](#).
11. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
12. Houd de CAP2 MIDI-plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.



LET OP

Ga direct door naar de volgende stap ([Wassen op pagina 65](#)). Laat het parelpetlet niet al te lange tijd zitten zonder dat er vloeistof aanwezig is.

Wassen

1. Verwijder de CAP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
3. Voeg 200 µl RSB toe aan elke well.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud bij 1800 tpm gedurende 4 minuten.

6. Plaats de plaat gedurende 2 minuten op de magnetische standaard.
7. Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.
8. Gebruik een pipet met fijne uiteinden om overgebleven RSB uit elke well te verwijderen.

Elueren

1. Verwijder de CAP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg 22 µl EE2+HP3-elutiemengsel toe aan elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat.
4. Gooi resterend EE2+HP3-elutiemengsel weg.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'ELU2' (Elutie 2).
9. Vortex de ET2 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
10. Voeg 5 µl ET2 toe aan elke overeenkomende bibliotheekwell in de nieuwe ELU2 PCR-plaat.
11. Breng voorzichtig 20 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de ELU2 PCR-plaat.
12. Gooi de lege CAP2 MIDI-plaat weg.
13. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU2 PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
14. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
15. Breng de SMB, EE2, HP3, RSB en ET2 terug naar de opslag.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de ELU2 PCR-plaat gedurende 1 minuut centrifugeren op 280 × g en gedurende maximaal 7 dagen bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Voorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren tot aan het eerstvolgende veilige stoppunt.

1. Zet een ijsemmer of iets dergelijks klaar.
2. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 31 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
PPC3	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Verrijkte bibliotheek amplificeren
EPM	-25 °C tot -15 °C	Houd het koud.	Verrijkte bibliotheek amplificeren

Tabel 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren Vorbereiden op sequencing

Verrijkte bibliotheek amplificeren

Bij deze stap worden primers gebruikt om verrijkte bibliotheken te amplificeren.

Vorbereiden

1. Als de ELU2-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 × g.

Procedure

1. Vortex PPC3 om te mengen en centrifugeer daarna kort.
2. Voeg 5 µl PPC3 toe aan elke bibliotheekwell van de ELU2 PCR-plaat.
3. Vortex de EPM 5 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
4. Voeg 20 µl EPM toe aan elke bibliotheekwell.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU2 PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
6. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
7. Plaats op een thermocycler en voer het EL-PCR-programma uit.
Raadpleeg [Thermocyclers programmeren op pagina 42](#).
Als u verder gaat met [Bibliotheken normaliseren op pagina 71](#), volg dan de instructies voor ontdooien in de paragraaf [Vorbereiden op protocol](#).
8. Zet de PPC3 en EPM terug in de opslag.

Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren

Bij deze stap wordt SPB gebruikt om de verrijkte bibliotheken te zuiveren van ongewenste reactiecomponenten. De parels worden tweemaal gewassen met verse 80% ethanol. De bibliotheken worden geëlueerd met RSB.

Vorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
 - SPB—Zorg ervoor dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn. Zorg ervoor dat voor deze procedure **SPB** wordt gebruikt, niet SMB.
 - RSB—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Bereid verse 80% ethanol in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

Tabel 33 Bereid verse 80% ethanol voor

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

- Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
- Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'BIND2' (Zuivering binding).
- Pak de magneet.

Procedure

Binden

- Verwijder de ELU2 PCR-plaat uit de thermocycler.
- Centrifugeer de ELU2 PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g.
- Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
- Voeg onmiddellijk 110 µl SPB toe aan elke bibliotheekwell van de BIND2 MIDI-plaat.
- Breng 50 µl van elke bibliotheek over van de ELU2 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BIND2 MIDI-plaat.
- Gooi de lege ELU2 PCR-plaat weg.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
- Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
- Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
- Plaats de BIND2 MIDI-plaat 5 minuten op de magnetische standaard.
- Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.

Wassen

- Was de parels als volgt.
 - Houd de BIND2 MIDI-plaat op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke well.
 - Wacht 30 seconden.
 - Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.
- Was de parels een **tweede** keer.
- Gebruik een pipet met fijne uiteinden om overgebleven EtOH uit elke well te verwijderen.

4. Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

1. Verwijder de BIND2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex om RSB te mengen.
3. Voeg 32 µl RSB toe aan elke bibliotheekwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND2 MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
6. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'PL' (gezuiverde bibliotheken).
9. Breng 30 µl van elk eluaat over van de BIND2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de PL PCR-plaat.
10. Gooi de lege BIND2 MIDI-plaat weg.
11. Breng een klevende plaatafdichting aan op de PL PCR-plaat.
12. Breng de SPB en RSB terug naar de opslag.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de PL PCR-plaat gedurende 1 minuut centrifugeren op 280 × g en gedurende maximaal 30 dagen bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Voorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is noodzakelijk om de protocolstappen uit te voeren tot aan het eerstvolgende veilige stoppunt.

1. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 34 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
LNA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
EE2	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren

Tabel 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
LNB1	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren Vorbereiden op sequencing
LNW1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
LNS1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren

- Als u op dezelfde dag verder gaat met [Vorbereiden op sequencing op pagina 75](#), volg dan de instructies voor ontdooien in de paragraaf [Vorbereiden op protocol](#).

Bibliotheken normaliseren

Bij dit proces wordt LNB1 plus additieven (LNA1) gebruikt om de hoeveelheid van elke bibliotheek te normaliseren om zeker te zijn van een uniforme weergave van de bibliotheek in de gepoolde bibliotheken. De parels worden tweemaal gewassen met LNW1. De bibliotheken worden geëluëerd met vers EE2+HP3-elutiemengsel en geneutraliseerd met LNS1.

Vorbereiden

- Prepareer de volgende reagentia.
 - LNB1—Zorg ervoor dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
 - LNA1—Vortex om te mengen.
 - EE2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - HP3—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
 - LNW1—Vortex om te mengen. Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
 - LNS1—Vortex om te mengen. Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- Vortex de LNB1 1 minuut lang om de parels te resuspenden.
Inverteer het LNB1-buisje om er zeker van te zijn dat alle parels geresuspendeerd zijn.
- Gebruik een pipet die is ingesteld op 800 µl om LNB1 10 keer op en neer te pipetteren om resuspending te verzekeren.
- Bereid onmiddellijk een vers LNA1+LNB1-mastermengsel voor in een conisch buisje.



LET OP

Resuspendeer het LNB1-parelpellet op de bodem van het buisje volledig om een inconsistente clusterdichtheid te voorkomen.

Tabel 36 LNA1+LNB1-mastermengsel*

Mastermengsel-component	4 biblio- theken	8 biblio- theken	16 biblio- theken	24 biblio- theken	48 biblio- theken
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg [Omgaan met reagentia op pagina 33](#) voor berekeningen.

- Vortex het LNA1+LNB1-mastermengsel. Leg opzij voor de stap [Binden op pagina 72](#).
- Bereid een vers EE2+HP3-elutiemengsel voor in een microcentrifugebuisje.

Tabel 37 EE2 + HP3-elutiemengsel voor het normaliseren van bibliotheken*

Elutiemengsel-component	4 biblio- theken	8 biblio- theken	16 biblio- theken	24 biblio- theken	48 biblio- theken
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg [Omgaan met reagentia op pagina 33](#) voor berekeningen.

- Vortex het verse elutiemengsel en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap [Elueren op pagina 73](#).
- Als de PL PCR-plaat werd bewaard, ontdooi deze dan tot kamertemperatuur, centrifugeer gedurende 1 minuut bij 280 × g. Pipetteren om te mengen.
- Label een nieuwe MIDI-plaat met 96 wells 'BBN' (normalisatie op basis van parels).
- Pak de magneet.

Procedure

Binden

- Vortex het LNA1+LNB1-mastermengsel.
- Voeg onmiddellijk 45 µl LNA1+LNB1-mastermengsel toe aan elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat.
- Gooi resterend LNA1+LNB1-mastermengsel weg.
- Breng 20 µl van elke bibliotheek over van de PL PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BBN MIDI-plaat.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
- Schud gedurende 30 minuten bij 1800 tpm.
- Breng klevende plaatafdichting aan op de PL PCR-plaat en breng deze terug naar de opslag.
- Plaats de BBN MIDI-plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.

Wassen

1. Was de parels als volgt.
 - a. Verwijder de BBN MIDI-plaat van de magnetische standaard.
 - b. Voeg 45 µl LNW1 toe aan elke bibliotheekwell.
 - c. Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
 - d. Schud bij 1800 tpm gedurende 5 minuten.
 - e. Plaats de BBN MIDI-plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
 - f. Houd de plaat op de magnetische standaard. Gebruik, zonder de parelpetlet te verstoren, een pipet die op 200 µl is ingesteld om al het supernatant uit elke well te verwijderen en weg te gooien.
2. Was de parels een *tweede* keer.
3. Gebruik een pipet met fijne uiteinden om het overgebleven supernatant uit elke well te verwijderen.

Elueren

1. Verwijder de BBN MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg 32 µl EE2+HP3-oplossing toe aan elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat.
4. Gooi resterend elutiemengsel weg.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud gedurende 2 minuten bij 1800 tpm.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'NL' (genormaliseerde bibliotheken).
9. Breng voorzichtig 30 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de NL PCR-plaat.



LET OP

Als de parels in de pipettips worden opgezogen, moet u de parels terugdoseren op de plaat op de magnetische standaard en wachten tot de vloeistof helder is (ca. 2 minuten) voordat u verder gaat naar de volgende stap van de procedure.

10. Gooi de lege BBN MIDI-plaat weg.
11. Vortex de LNS1 om te mengen.
12. Voeg 30 µl LNS1 toe aan elke bibliotheekwell in de nieuwe NL PCR-plaat.
13. Pipetteer vijf keer om te mengen.
14. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.

15. Breng de LNB1, LNA1, EE2, LNW1 en LNS1 terug naar de opslag.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de NL PCR-plaat gedurende 1 minuut centrifugeren op $280 \times g$ en gedurende maximaal 32 dagen bewaren bij $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ tot $-15 \text{ }^\circ\text{C}$.

Vorbereiden op protocol

Deze voorbereiding is vereist om de protocolstappen uit te voeren voorafgaand aan de sequencing.

Start ten minste één uur voor gebruik met de voorbereiding van de verbruiksartikelen voor sequencing uit de NextSeq 550Dx reagenskit met hoge output v2.5 (300 cycli) (onderdeelnr. 20028871).

1. Verwijder de Library Dilution Buffer (HT1) van -25 °C tot -15 °C opslag. Ontdooien tot kamertemperatuur. Bewaar het na ontdooien gekoeld.
2. Volg de bereidingsinstructies in de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor andere verbruiksartikelen in de kit.
 - NextSeq 550Dx Reagenscartridge met hoge output v2 (300 cycli)
 - NextSeq 550Dx buffercartridge v2 (300 cycli)
 - NextSeq 550Dx Stroomcelcartridge met hoge output v2.5 (300 cycli)
3. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 38 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
PhiX Internal Control (PX3 of PhiX)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur. Bewaar het na ontdooien gekoeld.	Vorbereiden op sequencing

Tabel 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vorbereiden op sequencing
RSB (roze label)	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vorbereiden op sequencing

Vorbereiden op sequencing

Elke DNA- en RNA-sequencing-run moet een positieve controle en een NTC omvatten. De NTC's voor DNA en RNA worden allemaal zo vaak als nodig gesequencet tot elke run een NTC bevat. Elke DNA- en RNA-run omvat een afzonderlijke positieve controle.

Vorbereiden

1. Lees de richtlijnen voor [Aantal bibliotheken en indexen selecteren op pagina 35](#).
2. Label een microcentrifugebuisje met 'dHP3' (verdunde HP3).
3. Label een microcentrifugebuisje met 'dPhiX' (verdunde PhiX).
4. Verwarm een verwarmingsblok voor tot 96 °C voor microcentrifugebuisjes.
5. Zet een ijsemmer of iets dergelijks klaar.

PhiX-controle verdunnen en denatureren

1. Vortex de HP3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
2. Combineer de volgende volumes in het dHP3-microcentrifugebuisje.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Vortex de dHP3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
4. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
5. Vortex de PhiX-controle om te mengen en daarna kort centrifugeren.
6. Combineer de volgende volumes in het dPhiX-microcentrifugebuisje.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX-controle
7. Voeg 10 µl dHP3 toe aan het dPhiX-buisje.
8. Gooi het dHP3-buisje weg.
9. Vortex het dPhiX-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
10. Incubeer de dPhiX 5 minuten lang bij kamertemperatuur om te denatureren.
11. Vortex de HT1 om te mengen.
12. Voeg onmiddellijk 980 µl voorgekoelde HT1 toe aan de dPhiX.
13. Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
14. Bewaar PhiX koud tot aan het gebruik in de bereiding voor de tweede verdunning.
De uiteindelijke concentratie is 20 pM dPhiX.
15. Breng de PhiX, HP3 en RSB terug naar de opslag.

Bibliotheken poolen en denatureren voor TSO Comprehensive (EU)

1. Als de NL PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens gedurende 1 minuut worden gecentrifugeerd op 280 × g.
2. Pipetteer/meng de bibliotheken in de NL PCR-plaat vijf keer voorzichtig met een meerkanaalspipet die is ingesteld op 30 µl.
Gebruik verse tips voor elke bibliotheek.



LET OP

Zorg ervoor dat de bibliotheken goed gemengd zijn, voor een optimale prestatie.

3. Selecteer een van de volgende opties om de bibliotheken te poolen, denatureren en verdunnen.
 - **[Optie 1]** Sequence de bibliotheken afgeleid van RNA-monsters en DNA-monsters tegelijkertijd. Zie [Optie 1: DNA- en RNA-bibliotheken samen op pagina 77](#).

- [Optie 2] Sequence de bibliotheken afgeleid van alleen DNA-monsters. Zie [Optie 2: Alleen DNA-bibliotheken op pagina 78](#).
- [Optie 3] Sequence de bibliotheken afgeleid van alleen RNA-monsters. Zie [Optie 3: Bibliotheken met alleen RNA op pagina 79](#).

Optie 1: DNA- en RNA-bibliotheken samen

1. Label een microcentrifugebuisje met 'PRL' (gepoolde RNA-bibliotheken).
2. Label een microcentrifugebuisje met 'PDL' (gepoolde DNA-bibliotheken).
3. Breng 10 µl van elke genormaliseerde RNA (cDNA)-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PRL-buisje. Pool geen twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
4. Breng 10 µl van elke genormaliseerde DNA-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PDL-buisje. Pool geen twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat. Dicht de randen en wells volledig af.
6. Vortex de PRL- en PDL-buisjes om te mengen.
7. Centrifugeer de PRL- en PDL-buisjes kort.
8. Incubeer de PRL- en PDL-buisjes in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
9. Houd de PRL- en PDL-buisjes koud gedurende 5 minuten.
10. Vortex de PRL- en PDL-buisjes om te mengen en daarna kort centrifugeren.
11. Houd de PRL- en PDL-buisjes koud.

Eerste verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje met DIL1 (verdunning 1).
2. Breng 20 µl PDL over naar het lege DIL1-buisje.
3. Voeg 5 µl PRL toe aan het DIL1-buisje.
4. Gooi de PDL- en PRL-buisjes weg.
5. Voeg 475 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
6. Vortex het DIL1-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Tweede verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met DIL2 (verdunning 2).
2. Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
3. Gooi het DIL1-buisje weg.
4. Voeg 1660 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:850).
5. Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX om te mengen en daarna kort centrifugeren.

6. Voeg 2,5 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
7. Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
8. Plaats 1300 µl DIL2 op de ontdooid NextSeq 550Dx reagenscartridge met hoge output v2 (300 cycli).
Raadpleeg voor meer informatie *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*.
9. Gooi het DIL2-buisje weg.
10. Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar vervolgens maximaal 32 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
11. Ga verder naar de sequencing.
Raadpleeg voor meer informatie *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*.

Optie 2: Alleen DNA-bibliotheken

1. Label een microcentrifugebuisje met 'PDL' (gepoolde DNA-bibliotheken).
2. Breng 10 µl van elke genormaliseerde DNA-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PDL-buisje.
Pool geen twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af.
4. Vortex het PDL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
5. Incubeer het PDL-buisje in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
6. Houd het PDL-buisje 5 minuten koud.
7. Vortex het PDL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
8. Houd het PDL-buisje koud.

Eerste verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje met DIL1 (verdunning 1).
2. Breng 10 µl PDL over naar het lege DIL1-buisje.
3. Gooi het PDL-buisje weg.
4. Voeg 190 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
5. Vortex de DIL1 om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Tweede verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met DIL2 (verdunning 2).
2. Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
3. Gooi het DIL1-buisje weg.
4. Voeg 1660 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:850).

5. Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX en daarna kort centrifugeren.
6. Voeg 2,5 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
7. Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
8. Plaats 1300 µl DIL2 op de ontdooide NextSeq 550Dx reagenscartridge met hoge output v2 (300 cycli).
Raadpleeg voor meer informatie *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*.
9. Gooi het DIL2-buisje weg.
10. Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar vervolgens maximaal 32 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
11. Ga verder naar de sequencing.
Raadpleeg voor meer informatie *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*.

Optie 3: Bibliotheken met alleen RNA

1. Label een microcentrifugebuisje met 'PRL' (gepoolde RNA-bibliotheken).
2. Breng 10 µl van elke genormaliseerde RNA (cDNA)-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PRL-buisje.
Pool geen twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
4. Vortex het PRL-buisje om te mengen.
5. Centrifugeer het PRL-buisje kort.
6. Incubeer het PRL-buisje in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
7. Houd het PRL-buisje koud gedurende 5 minuten.
8. Vortex het PRL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Houd het PRL-buisje koud.

Eerste verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje met DIL1 (verdunning 1).
2. Breng 10 µl PRL over naar het lege DIL1-buisje.
3. Gooi het PRL-buisje weg.
4. Voeg 190 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
5. Vortex de DIL1 om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Tweede verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met DIL2 (verdunning 2).
2. Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.

3. Gooi het DIL1-buisje weg.
4. Voeg 1646 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunding 1:843).
5. Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX en daarna kort centrifugeren.
6. Voeg 16,7 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
7. Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
8. Plaats 1300 µl DIL2 in de ontdooide NextSeq 550Dx reagenscartridge met hoge output v2 (300 cycli).
Raadpleeg voor meer informatie *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*.
9. Gooi het DIL2-buisje weg.
10. Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar maximaal 32 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
11. Ga verder naar de sequencing.
Raadpleeg voor meer informatie *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*.

Interpretatie van de resultaten

De sequencing-resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay worden voor elk monster afzonderlijk gerapporteerd in een pdf-rapport en een JSON-rapport. Er wordt ook op monsterniveau een Low Depth Report (Lagediepterapport) (`LowDepthReport.tsv`) gegenereerd.

Op runniveau worden de volgende outputbestanden gegenereerd:

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

Alleen varianten die de kwaliteitscontrole doorstaan, verschijnen in de definitieve pdf- en JSON-rapporten.

Raadpleeg *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)* voor gedetailleerde analyse-informatie.

Resultaten begeleidende diagnostiek

Voor elk beoogd gebruik van de begeleidende diagnostiek (CDx) zijn er drie mogelijke resultaten:

- **Positief**—Een variant of biomarker wordt gedetecteerd en geclassificeerd als niveau 1 (CDx).
- **Niet gedetecteerd**—Er worden geen varianten of biomarkers geassocieerd met het beoogde CDx-gebruik gedetecteerd in het monster. Het tumortype dat voor het monster is geselecteerd, is geschikt voor de CDx.
- **Geen resultaat**—Een bepaling van een variantstatus is niet mogelijk om een of meer van de volgende redenen:
 - Het beoogde CDx-gebruik was niet van toepassing op het geteste monster omdat het tumortype dat werd geselecteerd voor het monster niet geschikt is voor een tumortype van de CDx.

- De sequencing-run heeft niet voldaan aan de specificaties voor kwaliteitscontrole.
- De bibliotheek heeft niet voldaan aan de vereiste specificaties voor kwaliteitscontrole.
- Het geschikte nucleïnezuur is niet uitgevoerd.

Alle resultaten voor het beoogde gebruik van CDx worden gerapporteerd in de paragraaf 'Resultaten begeleidende diagnostiek' van het JSON-rapport. Alleen de beoogde gebruiken met een positief resultaat worden vermeld in de paragraaf 'Resultaten begeleidende diagnostiek' van het pdf-rapport.

Tumorprofilering van varianten

TSO Comprehensive (EU) is ontworpen voor het rapporteren van somatische varianten bij rapportage van varianten met bewijs van klinische relevantie of varianten met mogelijke klinische relevantie. De software voor het TSO Comprehensive (EU)-assay gebruikt een kennisbank die bepaalt of elke gedetecteerde en in aanmerking komende variant ([Tabel 2](#)) klinisch relevant of mogelijk klinisch relevant is op basis van bewijs voor therapeutische, diagnostische of prognostische associaties. De kennisbank kijkt ook of er associaties zijn vastgesteld (of niet) in het geteste tumortype. Gevoeligheids- of kankerrisicoassociaties zijn niet opgenomen in de kennisbank. Veelvoorkomende polymorfismen zijn verwijderd.

Voor varianten van tumorprofilering worden positieve resultaten geclassificeerd in genomische bevindingen met bewijs van klinische significantie (niveau 2) of genomische bevindingen met potentiële klinische significantie (niveau 3) op basis van de geïnstalleerde kennisbank en het geïdentificeerde tumortype.

Fouten bij de kwaliteitscontrole leiden tot geen resultaten voor de varianttypen die relevant zijn voor de mislukte meetwaarde van de kwaliteitscontrole. Raadpleeg [Tabel 40](#) en [Tabel 41](#) voor meer informatie.

Tumorprofileringposities met onvoldoende diepte worden vermeld in het Low Depth Report (Lagediepterapport) en niet in het TSO Comprehensive (EU)-rapport.

Kwaliteitscontrole

- Raadpleeg [Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27](#) voor informatie over de kwantificering van nucleïnezuren en de minimumvereisten voor de inputmaterialen.
- De geldigheid van een sequencing-run en een monster worden automatisch bepaald en gerapporteerd door de Analysemodule voor TSO Comprehensive (EU). Raadpleeg *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)* voor gedetailleerde analyse-informatie.
- Het TSO Comprehensive (EU)-rapport, dat beschikbaar is in pdf- en JSON-opmaak, vat de resultaten van de kwaliteitscontrole samen. De rapportbestanden bevinden zich in de analysemap. Raadpleeg de *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)* voor de locatie van de analysemap (bevat pdf- en JSON-rapporten) en de runmap.

Tabel 40 TSO Comprehensive (EU) Rapportresultaat van de kwaliteitsstatistieken

Outputtype	Metrisch gegeven	Specificatie	Beschrijving	Impact van specificatiefalen*
Sequencing-run	PCT_PF_READS (%)	$\geq 80,0$	Percentage bepalingen dat door het filter komt (PF).	De sequencing-run is ongeldig gemaakt. Er zijn geen resultaten gerapporteerd voor enig monster in de run.
	PCT_Q30_R1 (%)	$\geq 80,0$	Gemiddeld percentage basebepalingen met kwaliteitsscore Q30 of hoger voor Bepaling 1.	De sequencing-run is ongeldig gemaakt. Er zijn geen resultaten gerapporteerd voor enig monster in de run.
	PCT_Q30_R2 (%)	$\geq 80,0$	Gemiddeld percentage basebepalingen met kwaliteitsscore Q30 of hoger voor Bepaling 2.	
DNA-bibliotheken	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 OF > 3106 en P_VALUE $\leq 0,049$	Een meetwaarde die de kans op besmetting beoordeelt met behulp van de VAF van veelvoorkomende varianten. De verontreinigingsscore op basis van de VAF-verdeling van SNP's. De contaminatie-P-waarde wordt gebruikt om sterk herschikte genomen te beoordelen. Dit is alleen van toepassing wanneer de contaminatiescore boven de bovengrens van de specificatielimiet ligt.	Geen DNA-resultaten gemeld.

Outputtype	Metrisch gegeven	Specificatie	Beschrijving	Impact van specificatiefalen*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	De mediane fragmentlengte in het monster.	Geen TMB- of kleine DNA-variantresultaten gemeld.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (telling)	≥ 150	Mediane exonfragmentdekking van alle exonbasen.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Percentage exonbasen met fragmentdekking van 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (aantal)	≥ 40	Het aantal MSI-locaties dat kan worden gebruikt voor MSI-bepaling (aantal microsatellietlocaties met voldoende bestrijkende aflezingen om microsatellietinstabiliteit te identificeren).	Geen MSI-resultaten gemeld.
	COVERAGE_MAD (telling)	$\leq 0,210$	De mediaan van de absolute deviaties van de mediaan van de genormaliseerde telling van elk CNV-doelgebied.	Geen genamplificatieresultaten gemeld.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_DOEL (telling)	$\geq 1,0$	De mediane ruwe bin-telling per CNV-doel.	
RNA-bibliotheken	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	De mediane fragmentlengte in het monster.	Geen fusies of splicevariantresultaten gemeld.

Outputtype	Metrisch gegeven	Specificatie	Beschrijving	Impact van specificatiefalen*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (coëfficiënt)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X is een maat voor de uniformiteit van de dekking. Voor elk gen met ten minste 500x dekking wordt de variatiecoëfficiënt van de dekking van het genlichaam berekend. Deze meetwaarde is de mediaan van deze waarden. Een hoge waarde duidt op een grote variatie en op een probleem bij de bibliotheekpreparatie, zoals een lage hoeveelheid ingevoerd monster en/of problemen met het afschakelen van de probe. Deze meetwaarde wordt berekend uit alle aflezingen (inclusief aflezingen gemarkeerd als duplicaten).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (telling)	$\geq 9.000.000$	Het totale aantal bepalingen die zijn toegewezen aan de doelgebieden. Deze meetwaarde wordt berekend uit alle aflezingen (inclusief aflezingen gemarkeerd als duplicaten).	

* Bij succesvolle resultaten wordt 'PASS' (Geslaagd) getoond.

Tabel 41 TSO Comprehensive (EU) Rapportresultaat van de controlestatistieken

Outputtype	Metrisch gegeven	Specificatie	Impact van specificatiefalen*
Positieve controle	DNA External Control (DNA-externe controle)	23 van 24 gespecificeerde varianten gedetecteerd	Patiëntmonsters moeten op basis van resultaten van controlemonsters handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
	RNA externe controle	12 van 13 gespecificeerde varianten gedetecteerd	
Amplificatiereagenscontrole	Mediane exondekking van DNA voor TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Patiëntmonsters moeten op basis van resultaten van controlemonsters handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
	Grenswaarde RNA-gen boven mediaan	≤ 1	

* Bij succesvolle resultaten wordt 'PASS' (Geslaagd) getoond.

- Herhaal de sequencing-runs die ongeldig zijn.
- Herhaal tests van bibliotheken met de volgende resultaten:
 - Gecontamineerde DNA-bibliotheken
 - Ongeldige RNA-bibliotheken
 - Tests kunnen worden herhaald om meer variant- of biomarkerresultaten te verkrijgen voor DNA-bibliotheken die ongeldig werden verklaard voor één, maar niet alle varianttypen.
- Positieve controles worden beoordeeld voor variantbepaling. Indien positieve controles niet voldoen aan de specificaties voor variantbepaling, moet de sequencing-run handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
- NTC's worden beoordeeld ten opzichte van de mediane exondekking voor DNA en genen boven de mediane grenswaarde voor RNA. Indien negatieve controles niet aan de specificaties voldoen, moeten de bibliotheekpreparatiecyclus en alle bijbehorende sequencing-runs handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
- Voer in overeenstemming met lokale, provinciale en/of nationale voorschriften of accreditatievereisten aanvullende kwaliteitscontrolemaatregelen uit.

Raadpleeg voor meer informatie over het herhalen van sequencing-runs of het testen van bibliotheken
[Problemen oplossen op pagina 87](#).

Problemen oplossen

Gebruik de volgende tabel om problemen in de workflow op te lossen. Als een sequencing-run of bibliotheekpreparatie van een monster tweemaal faalt, is extra foutopsporing noodzakelijk. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina.

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen handeling
De sequencing-run voldoet niet aan de specificaties van de kwaliteitscontrole voor een run.	<ul style="list-style-type: none"> Fout bij pooling Fout bij verdunning Onvolledige warmtedenaturatie van PRL/PDL Problemen met de voorbereiding van verbruiksartikelen voor sequencing (bijvoorbeeld niet voldoende ontdooid, condensatie/vuil op stroomcel) 	<ul style="list-style-type: none"> Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg Voorbereiden op sequencing op pagina 75.
	<ul style="list-style-type: none"> Onjuist gebruik van verrijgingsprobes (bijvoorbeeld OPR1-probes gebruikt voor DNA-monsters, OPD2-probes gebruikt voor RNA-monsters) Fout in de workflow voor bibliotheekvoorbereiding tijdens of na de eerste hybridisatiestap. 	Herhaal de verrijgingsstappen voor bibliotheken van Amplified Libraries Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters, (ALS) PCR-plaat. Raadpleeg Eerste hybridisatie voorbereiden op pagina 58 .
	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer	Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg Denaturatie en hybridisatie RNA op pagina 44 of Fragmenteren van gDNA op pagina 49 .
	Fout in de workflow voor bibliotheekvoorbereiding tijdens of voorafgaand aan de index-PCR-stap	Herhaal de verrijgingsstappen voor bibliotheken van Amplified Libraries Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters, (ALS) PCR-plaat. Raadpleeg Eerste hybridisatie voorbereiden op pagina 58 .

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen handeling
	Instrumentprobleem	Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina.
Fout bij het genereren van rapporten of algemene instrumentfout (netwerkfout, fout bij laden/uitladen reagentia, etc.)	Software- of instrumentprobleem.	Raadpleeg Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661) voor hulp bij het genereren van rapporten. Neem voor aanvullende hulp contact op met de Technische ondersteuning van Illumina.
De DNA-bibliotheek voldoet niet aan de specificaties voor kwaliteitscontrole.	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer.	Zorg voor de juiste monsterinvoer en herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf de stap 'Fragmenteren van gDNA'. Raadpleeg Monstervereisten op pagina 26 en Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27 .
	Gebruiksfout of apparatuurfout in de assay-workflow.	Herhaal de bibliotheekvoorbereiding vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de Technische ondersteuning van Illumina als er onbekende of andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen. <ul style="list-style-type: none"> Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg Vorbereiden op sequencing op pagina 75. Herhaal de verrijkingsstappen voor bibliotheken van Amplified Libraries Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters, (ALS) PCR-plaat. Raadpleeg Eerste hybridisatie voorbereiden op pagina 58. Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg Fragmenteren van gDNA op pagina 49.

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen handeling
	<p>Er wordt niet voldaan aan de criteria voor CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE</p>	<p>Lees Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen voor informatie over het vermijden van kruisbesmetting. Controleer de lay-out van de plaat en de bibliotheekindexering om er zeker van te zijn dat bibliotheken van dezelfde index niet samen gesequencet zijn.</p> <p>Start de bibliotheekpreparatie voor de betreffende bibliotheken vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg Fragmenteren van gDNA op pagina 49. Er is mogelijk besmetting opgetreden tijdens de monsterextractie. Het kan nodig zijn om de extractie te herhalen om er zeker van te zijn dat het monster vrij is van besmetting.</p>
	<p>Bruikbare MSI mislukt</p>	<p>Lees de instellingen voor gebruik en bediening van de fabrikant van de ultrasonicator (waaronder het waterniveau en buistype). Zorg ervoor dat het juiste monster is ingevoerd in de assay.</p> <p>Raadpleeg Monstervereisten op pagina 26 en Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27.</p> <p>Extractie van een nieuw monster en/of herhaling van de stap voor het fragmenteren van gDNA kan nodig zijn als het monster te veel gefragmenteerd of beschadigd is.</p>
	<p>Het monster is overmatig gefragmenteerd of heeft nucleïnezuurbeschadiging die invloed heeft op het vermogen om voldoende unieke bibliotheken te genereren.</p>	<p>Controleer de Configuratie-instellingen voor de ultrasonicator voor DNA-fragmentatie op pagina 23 en de Instellingen voor gebruik en bediening van de fabrikant van de ultrasonicator (inclusief het waterniveau en buistype). Zorg ervoor dat het juiste monster is ingevoerd in de assay.</p> <p>Raadpleeg Monstervereisten op pagina 26 en Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27.</p> <p>Extractie van een nieuw monster en/of herhaling van de stap voor het fragmenteren van gDNA kan nodig zijn als het monster te veel gefragmenteerd of beschadigd is.</p>

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen handeling
De RNA-bibliotheek voldoet niet aan de specificaties voor kwaliteitscontrole.	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer.	<p>Zorg voor de juiste monsterinvoer en herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf de stap 'Denaturatie en hybridisatie RNA'.</p> <p>Raadpleeg Monstervereisten op pagina 26 en Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27.</p>
	Gebruiksfout of apparatuurfout in de assay-workflow.	<p>Herhaal de bibliotheekvoorbereiding vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de Technische ondersteuning van Illumina als er onbekende of andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg Vorbereiden op sequencing op pagina 75. • Herhaal de verrijkingsstappen voor bibliotheken van Amplified Libraries Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters, (ALS) PCR-plaat. Raadpleeg Eerste hybridisatie voorbereiden op pagina 58. • Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg Denaturatie en hybridisatie RNA op pagina 44.
	Het monster is overmatig gefragmenteerd of heeft nucleïnezuurbeschadiging die invloed heeft op het vermogen om voldoende unieke bibliotheken te genereren.	<p>Zorg ervoor dat het juiste monster is ingevoerd. Raadpleeg Monstervereisten op pagina 26 en Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 27.</p> <p>Extractie van een nieuw monster kan nodig zijn als het monster te veel gefragmenteerd of beschadigd is.</p>

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen handeling
Positieve controle mislukt (DNA/RNA).	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer voor de positieve controle.	<p>Zorg voor de juiste invoer in de assay. Controleer de plaatlay-out en zorg dat de juiste reagentia (probes, indexen) zich in de juiste wells bevinden.</p> <p>Zorg ervoor dat het positief controlemonster volgens het label wordt opgeslagen.</p> <p>Herhaal voor alle monsters die de positieve controle delen de bibliotheekpreparatie vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de Technische ondersteuning van Illumina als er onbekende of andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen.</p>
	Gebruiksfout of apparatuurfout in de assay-workflow.	<ul style="list-style-type: none"> • Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg Voorbereiden op sequencing op pagina 75. • Herhaal de verrijkingsstappen voor bibliotheken van Amplified Libraries Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters, (ALS) PCR-plaat. Raadpleeg Eerste hybridisatie voorbereiden op pagina 58. • Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg Denaturatie en hybridisatie RNA op pagina 44 of Fragmenteren van gDNA op pagina 49.
NTC mislukt (DNA/RNA).	Er is kruisbesmetting opgetreden of het werkgebied is besmet.	<p>Raadpleeg het gedeelte 'Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen' voor informatie over het ontsmetten van werkgebieden en het vermijden van kruisbesmetting.</p> <p>Controleer de lay-out van de plaat en de bibliotheekindexering om er zeker van te zijn dat bibliotheken van dezelfde index niet samen gesequencet zijn.</p> <p>Herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow voor alle bibliotheken die de amplificatiereagenscontrole delen.</p>
	Onjuiste indexering van de bibliotheek.	

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen handeling
De software geeft aan dat er geen positieve en/of negatieve controles zijn opgenomen in de sequencing-run.	Onjuiste toewijzing van het kankertype in de runplanning van Local Run Manager.	Plaats de analyse opnieuw in de wachtrij met correct geïdentificeerde controles zoals aangegeven in de Workflowhandleiding voor de analysemodule (zie <i>Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)</i>).

Prestatiekenmerken

TSO Comprehensive (EU) is een gericht NGS-panel dat veranderingen in 517 genen detecteert. Kleine DNA-varianten (single-nucleotide varianten (SNV's), multi-nucleotide-varianten (MNV's), inserties en deleties) komen in aanmerking voor rapportage van alle 517 genen. Tumormutatielast wordt gerapporteerd als een score gebaseerd op het aantal niet-driver somatische varianten per megabase (zie *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analysemodule (documentnr. 200008661)* voor details). MSI wordt als status gerapporteerd. Genamplificaties van de MET- en ERBB2-genen komen in aanmerking voor rapportage. Fusies in de 23 genen die zijn vermeld in de [Samenvatting en uitleg van de assay op pagina 1](#) komen in aanmerking voor rapportage. Splicingvarianten van de MET- en EGFR-genen komen in aanmerking voor rapportage. Om te worden gerapporteerd, moeten varianten gedetecteerd worden en bewijs hebben in de kennisbank van het TSO Comprehensive (EU)-assay en in aanmerking komen op basis van het geteste weefseltype. Om te worden gerapporteerd, wordt voor NTRK-fusies vereist dat de fusiepartner 5' is en dat het NTRK-kinasedomein intact is.

Bij kleine DNA-varianten werd een representatieve benadering voor validatie van de doelgenen in het panel uitgevoerd met gegevens die SNV's, MNV's, inserties en deleties vertegenwoordigen. Bij genamplificaties, fusies en splicevarianten werden tests uitgevoerd op het genniveau. TMB en MSI werden geëvalueerd waar aangegeven. Voor de NTRK-fusies CDx-claims werden fusies in FFPE-monsters getest in onderzoeken die gericht waren op de prestaties die specifiek waren voor de claim (d.w.z. detectielimiet, intralaboratoriumprecisie, reproduceerbaarheid, nauwkeurigheid en klinische prestaties).

[Tabel 42](#) geeft definities van meetwaarden berekend in verschillende onderzoeken.

Tabel 42 Definities van statistieken

Term	Definitie
Positieve procentuele overeenkomst (Positive Percent Agreement, PPA)	Het percentage positieven die juist zijn geïdentificeerd uit de totale positieven ten opzichte van een orthogonale methode.

Term	Definitie
Negatieve procentuele overeenkomst (Negative Percent Agreement, NPA)	Het percentage negatieven die juist zijn geïdentificeerd uit de totale negatieven ten opzichte van een orthogonale methode.
Algehele procentuele overeenkomst (Overall Percentage Agreement, OPA)	Het percentage van positieven en negatieven die correct zijn geïdentificeerd uit de totale observaties ten opzichte van een orthogonale methode.
Percentage positieve bepalingen (PPC)	Percentage positieve observaties voor een doel van de observaties die werden verwacht positief te zijn voor het doel.
Percentage negatieve bepalingen (PNC)	Percentage negatieve observaties voor een doel van de observaties die werden verwacht negatief te zijn voor het doel.
n/N	Het aantal positieve of negatieve waarnemingen (n) gedeeld door het totale aantal waarnemingen (N) wordt gebruikt om respectievelijk de PPC of PNC te berekenen. De waarden van n en N kunnen op verschillende niveaus worden bepaald (bijv. per variant of gen) of worden samengevoegd in een groep (bijv. SNV's).
Standaarddeviatie (SD)	een statistische maat die de mate van variatie of spreiding van waarden rond het gemiddelde van een variabele aangeeft.
Procentuele variatiecoëfficiënt (%CV)	Standaarddeviatie gedeeld door het gemiddelde als percentage.

Kruisbesmetting

Het onderzoek naar kruisbesmetting werd uitgevoerd om te evalueren of fout-positieve resultaten te wijten waren aan besmetting tussen de wells tijdens de voorbereiding van de monsterbibliotheek of besmetting tussen de runs bij opeenvolgende sequencing-runs. Deze analyse werd uitgevoerd voor kleine DNA-varianten (die ook van invloed zijn op TMB), fusies, genamplificaties en MSI. Er werden bibliotheken geprepareerd van gekarakteriseerde monsters in een dambordopstelling met afwisselende monsters om besmetting van well tot well te evalueren, en met afwisselende indexen om besmetting van run tot run te evalueren bij opeenvolgende sequencing-runs op dezelfde NextSeq 550Dx-instrument. Het onderzoek naar kruisbesmetting toonde geen waargenomen besmettingsvoorvallen door de gedetecteerde varianten in elk monster te onderzoeken. Er werden ook geen fout-positieven gedetecteerd.

Twee QC-metrieken (CONTAMINATION_SCORE en P_VALUE) werden ontworpen voor het TSO Comprehensive (EU)-assay om monsterbesmetting in DNA-monsters te detecteren. Gevoeligheid voor verontreinigingsdetectie werd geëvalueerd. FFPE tumor-DNA-monsters werden gemengd met verschillende hoeveelheden FFPE normale DNA-monsters om doelbewust verontreinigde monsters te maken.

In totaal werden 1112 verontreinigingswaarnemingen gegenereerd en werd verontreiniging gedetecteerd in 95% (1054) van de waarnemingen. Het detectiepercentage werd verhoogd tot 96% (939/976) wanneer het percentage verontreiniging tussen 10% en 90% (massa/massa) lag. Van de 37 waarnemingen tussen 10% en 90% contaminatie waarbij geen verontreiniging werd gedetecteerd, voldeden er 12 niet aan de dekkingsspecificatie om kleine DNA-varianten te bepalen. Lage dekking belemmert de detectie van verontreiniging, maar kleine DNA-varianten worden niet gerapporteerd, wat het effect van verontreiniging vermindert. Vijftien waarnemingen voldeden niet aan de genamplificatiespecificatie (gemiddelde baktelling QC-meetwaarde) om genamplificatie te bepalen. Er wordt geen resultaat voor genamplificatie gerapporteerd voor de monsters.

Het onderzoek heeft aangetoond dat het TSO Comprehensive (EU)-assay naar verwachting een laag aantal gevallen van kruisbesmetting van well naar well of van run tot run zal hebben. Deze resultaten, samen met de contaminatiestatistieken in de software, beperken het risico op valse variantresultaten als gevolg van monstercontaminatie.

Evaluatie nucleïnezuur-extractiekit

Drie commercieel beschikbare DNA- en RNA-extractiekits werden geëvalueerd met TSO Comprehensive (EU). De drie extractiekits isoleerden zowel DNA als RNA uit dezelfde FFPE-weefselgedeelten. De kits verschilden in deparaffineermiddel en stappen voor het binden van nucleïnezuur (Tabel 43). Kit 1 was de meest gebruikte extractiekit om de prestaties van TSO Comprehensive (EU) te bepalen.

Tabel 43 Kenmerken van de kit

Kit	Deparaffineer middel	Nucleïnezuur binden
1	Bedrijfseigen	Kolom
2	Xyleen	Kolom
3	Minerale olie	Magnetische parels

Tabel 44 en Tabel 45 geven een overzicht van de effecten van extractiekits op de validiteit van de bibliotheek en de variantbepaling. Het verschil werd gerapporteerd als de gemiddelden van de extractiekits significant van elkaar verschilden. De gemiddelde verschillen tussen extractiekits werden berekend met kit 1 als controle, omdat kit 1 werd gebruikt om de meeste nucleïnezuren te extraheren die voor analytische onderzoeken met TSO Comprehensive (EU) werden gebruikt. Het gemiddelde verschil ten opzichte van kit 1 werd gerapporteerd om te illustreren hoe verschillende extractiekits de andere analytische onderzoeken met TSO Comprehensive (EU) zouden beïnvloeden.

Tabel 44 Invloed van extractiekit op de validiteit van bibliotheken

Varianttype	QC-metwaarde van bibliotheek	Gemiddeld verschil ten opzichte van kit 1
Kleine DNA-varianten/TMB	Mediane exondekking (telling)	Kit 2 lager met 56 aflezingen
	PCT Exon 50X (%)	Kit 3 hoger met 0,298%
	Mediane grootte van het inzetstuk (bp)	Kit 2 en kit 3 lager met 3 bp
DNA MSI	Bruikbare MSI-sites	Kit 3 hoger met 8 locaties
DNA-genamplificatie	Dekking MAD (telling)	Kit 2 lager met 0,0043
	Mediaan aantal bakken	Kit 2 lager met 0,5825, Kit 3 hoger met 0,3086
RNA (fusie/splicevarianten)	Mediane grootte van het inzetstuk (bp)	Kit 3 hoger met 2 bp
	Logboek (mediaan CV Gene500X)	Kit 2 hoger met 0,029
	Totaal op doelbepalingen	Geen significant verschil

Er werd waargenomen dat extractiekit 2 en kit 3 meer ondersteunende aflezingen hadden, zodat fusies en splicevarianten in de buurt van de LoD een hogere kans op detectie hebben als gevolg van de selectie van extractiekit.

Tabel 45 Invloed van de extractiekit op de variantbepaling

Varianttype (eenheden)	Variantbepaling (gemiddeld verschil ten opzichte van kit 1)
Kleine DNA-varianten (VAF)	Niet technisch significant Gerichte varianten: variantie tussen kits was klein ten opzichte van resterend Niet-gerichte varianten: Geen significante verschillen voor de eerste twee VAF-bakken. Geen betekenisvolle verschillen wanneer statistische significantie werd waargenomen.
TMB (mutatie per megabase)	Niet technisch significant, variantie tussen kits was klein ten opzichte van resterend
MSI (% instabiele plaatsen)	Kit 3 lager bij 1,9% instabiele locaties
Genamplificatie (fold change)	Kit 2 (0,06) en Kit 3 (0,08) hogere fold change
Fusies (ondersteunende aflezingen)	Kit 2 had een toename van 51% en Kit 3 had een toename van 23% in ondersteunende aflezingen
Splicevarianten (ondersteunende aflezingen)	Kit 2 en Kit 3 hadden een toename van 48% in ondersteunende aflezingen

Interfererende stoffen

De impact van mogelijke endogene en exogene stoffen op de prestaties van de TSO Comprehensive (EU)-assay werd geëvalueerd. Endogene stoffen (melanine en hemoglobine) werden tijdens het nucleïnezuurextractieproces aan de monsters toegevoegd. Tijdens het extractieproces voor nucleïnezuur waren exogene stoffen (ethanol, xyleen, en proteïnase K) aanwezig; deze werden ook vóór de bibliotheekpreparatie in het gezuiverde nucleïnezuur toegevoegd. Waar interferentie werd waargenomen met verrijkte proteïnase K, werden verhoogde concentraties proteïnase K tijdens het extractieproces ook geëvalueerd. Overtollige indexprimers (15% en 30%) werden toegevoegd tijdens de bibliotheekvoorbereiding. Met uitzondering van indexprimers werden er stoffen toegevoegd aan FFPE-monsters van hersenen, borst, dikke darm, long, medullaire schildklier, NSCLC, eierstok, prostaat, speeksel, huid, weke delen en schildklierweefsel - acht monsters werden geëxtraheerd voor DNA-analyse en 13 werden geëxtraheerd voor RNA-analyse. Voor indexprimers werden zes FFPE-monsters van drie verschillende weefseltypen (schildklier, blaas, dikke darm) gebruikt voor DNA-analyse, en vijf FFPE-monsters van vier verschillende weefseltypen (long, schildklier, dikke darm, borst) voor RNA-analyse. Voor elk van de 16 unieke monsters was er een endogene controle zonder toevoeging en een exogene controle met buffer of toegevoegd water. Het effect van necrose werd beoordeeld op een andere set van acht FFPE-monsters van hersen-, dikke darm- en longweefsel. Er was een controle zonder necrose op macrodissectieniveau voor elk necrosemonster. Voor alle interferenten werden per monster en per stof drie replicaten getest met het TSO Comprehensive (EU)-assay en vergeleken met hun respectieve controlestatus voor detectie van kleine DNA-varianten, genamplificaties, RNA-fusies en -splicevarianten, alsook voor de MSI-status en TMB-score. Zowel CDx- als tumorprofileringsvarianten werden opgenomen.

Detectie van DNA-varianten

Melanine (0,2 µg/ml), hemoglobine (2 mg/ml), ethanol (5%), Proteïnase K (0,04 mg/ml in nucleïnezuur) en xyleen (0,0001%) interfereren niet met de TMB-score, MSI-status, kleine DNA-varianten en genamplificaties.

Detectie van RNA-varianten

De gegevens ondersteunen geen interferentie van melanine (0,2 µg/ml), ethanol (5%) en xyleen (0,0001%) op RNA-fusies of splice-varianten. Hemoglobine (2 mg/ml) interfereerde (verminderde ondersteunende aflezingen) met drie verschillende splice-varianten in het MET-gen. Een splice-variant in het AR-gen (drie verschillende monsters) en één in het EGFR-gen (één monster) werden niet aangetast. Als het laboratorium RNA uitvoert met de assay, moet weefsel met hemoglobine worden vermeden of tot een minimum worden beperkt bij het verkrijgen van plakjes uit het weefselblok.

Proteïnase K (0,04 mg/ml in nucleïnezuur) interfereerde met RNA-fusies en splice-varianten. Proteïnase K werd getest bij 2,6 mg/ml en 5,2 mg/ml tijdens het extractieproces, wat 2x en 4x de standaardconcentratie is in een commercieel verkrijgbare kit. Fusies werden geremd bij 4x maar niet bij 2x Proteïnase K. Splice-varianten werden geremd bij 2x Proteïnase K. Proteïnase K of een equivalent enzym mag tijdens de extractie niet verhoogd worden ten opzichte van de standaardconcentratie voorzien in een extractiekit.

De splicevariant die de aflezingsen ondersteunt, neemt af bij 30% overtollige indexprimers, maar niet bij 15% overtollige primers.

Necrose

De aanwezigheid van necrotisch weefsel tot 70% interfereerde niet met de TMB-score, MSI-status of kleine DNA-varianten. De detectie van RNA-varianten (aantal ondersteunende aflezingsen) en genamplificaties (fold change) was verminderd in monsters met $\geq 25\%$ en $\geq 23\%$ (per gebied) necrotische inhoud in het weefseloppervlak. Als het monstergedeelte $\geq 23\%$ necrotische inhoud bevat in het totale weefselgebied, moet het necrotische weefsel op macroniveau worden weggesneden.

Stabiliteit

Realtime stabiliteit

Realtime stabiliteit werd gebruikt om de levensduur van de kit voor het TSO Comprehensive (EU)-assay vast te stellen bij opslag volgens de omstandigheden op het label. De opzet van het onderzoek was gebaseerd op het testen van drie partijen reagentia en maakte gebruik van de opzet van het klassieke stabiliteitsonderzoek zoals beschreven in CLSI EP25-A. De kits werden voor de duur van het onderzoek opgeslagen in de uiteindelijke kitconfiguratie, bij opslagomstandigheden die op het productetiket zijn vermeld. Bevroren kitonderdelen werden bewaard bij $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ tot $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gekoelde kitonderdelen werden bewaard bij $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ tot $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kits werden getest op uiterlijk en criteria voor functionele kitvrijgave op aangegeven tijdstippen. Daarnaast werden trends in de variantbepaling en de kwaliteitsmetingen van het monster geanalyseerd voor het controlemateriaal voor de kwaliteitsmetingen. Voor elke reagens werd de levensduur vastgesteld. De vervaldatum werd toegewezen op basis van de productiedatum en levensduur. De houdbaarheid van de kit werd toegewezen op basis van het vroegst vervallende reagens.

Fysische stabiliteit kit

De gebruiksstabiliteit van de kit voor het TSO Comprehensive (EU)-assay werd gedurende de levensduur beoordeeld onder standaard gebruiksomstandigheden ter ondersteuning van het meermaals gebruiken van de kit. De reagenskit werd onderworpen aan meerdere malen vriezen/ontdooien en getest om tot wel 4 maal gebruik van de kit te ondersteunen. Daarnaast werden 8 RNA- en 8 DNA-bibliotheken in totaal 3 keer voorbereid om het maximaal aantal ondersteunde bibliotheken (24 DNA- en 24 RNA-bibliotheken per kit) te testen. Voor alle geteste vries- en dooicycli en tijdstippen werd aan alle criteria voor het vrijgeven van functionele kits voldaan. Tests van FFPE-monsters met reagentia ≥ 25 maanden oud werden uitgevoerd om de impact van tests tijdens het gebruik op variantbepaling te beoordelen. Een kwalitatieve analyse van doelvarianten liet zien dat cycli tijdens het gebruik geen invloed hadden op de variantbepaling.

Stabiliteit van nucleïnezuur

De stabiliteit van nucleïnezuren (DNA en RNA) en de bijbehorende kwantificering voor gebruik met de TSO Comprehensive (EU)-assay werd geëvalueerd met behulp van FFPE-monsters van meerdere weefseltypen. FFPE-blokken werden verdeeld en alle nucleïnezuren werden in één keer geëxtraheerd. Geëxtraheerd nucleïnezuur werd grondig gemengd, gekwantificeerd, gecontroleerd op nucleïnezuurkwaliteit en gealiquoteerd in twee sets buisjes voor eenmalig gebruik die voor twee tijdstippen moesten worden ingevroren: T0-controle (uitgangswaarde) en T1-test (≥ 28 dagen). Al het geëxtraheerde RNA werd bewaard bij -85°C tot -65°C en al het geëxtraheerde DNA werd bewaard bij -25°C tot -15°C gedurende de aangegeven tijdsduur, en vervolgens verwerkt door de TSO Comprehensive (EU)-assay over meerdere herhalingen en operators. De T1-testconditie werd vergeleken met de controle voor MSI-status, TMB-score, genamplificaties, kleine DNA-varianten, RNA-fusies en RNA-splicevarianten. De gegevens geven aan dat nucleïnezuren en de bijbehorende kwantificering voor gebruik met de TSO Comprehensive (EU)-assay tot 28 dagen stabiel zijn wanneer ze worden bewaard bij de aanbevolen temperaturen (RNA bij -85°C tot -65°C en DNA bij -25°C tot -15°C).

Bibliotheekstabiliteit

De stabiliteit van bibliotheken, elk gebruikmakend van één van de zes veilige stoppunten voor de assay (zie [Tabel 5](#)) werd geëvalueerd met FFPE-monsters afkomstig van verschillende weefseltypen. Controlebibliotheken (T0, zonder stoppunten) werden direct na afloop van de workflow gesequencet. Aliquots van dezelfde bibliotheken werden bewaard bij de stoppunten bij -25°C tot -15°C gedurende de periode (T1) die overeenkomt met de dagen vermeld in [Tabel 5](#). T1 werd vergeleken met T0 voor kleine DNA-varianten, TMB, genamplificaties, MSI, RNA-fusies en RNA-splicevarianten, inclusief CDx- en tumorprofileringsvarianten. De gegevens wijzen erop dat bibliotheken die met de TSO Comprehensive (EU)-assay worden gegenereerd, stabiel zijn volgens de gebruiksaanwijzing.

Stabiliteit van FFPE-weefsel op een objectglasje

De stabiliteit van FFPE-weefsels op een objectglasje voor gebruik met de TSO Comprehensive (EU)-assay werd geëvalueerd door ze op te delen in FFPE-blokken (secties van $5\ \mu\text{m}$) uit verschillende unieke monsters, gemonteerd op objectglasjes, gevolgd door opslag bij kamertemperatuur (22°C) gedurende twee tijdstippen. RNA werd geëxtraheerd en bewaard bij -65°C tot -85°C en DNA werd geëxtraheerd en bewaard bij -15°C tot -25°C gedurende minder dan 1 week voorafgaand aan de test. Nucleïnezuurmateriaal werd gekwantificeerd en vervolgens binnen 24 uur voor elk tijdstip via de TSO Comprehensive (EU)-assay verwerkt. Op elk tijdpunt werden meerdere replicaties en operators per monster getest met de TSO Comprehensive (EU)-assay en vergeleken met het T0-tijdpunt voor MSI, TMB, genamplificaties, kleine DNA-varianten, RNA-fusies en RNA-splicevarianten, waaronder CDx- en tumorprofileringsvarianten. Variantbepaling werd beoordeeld en voldeed aan alle acceptatiecriteria, wat aangeeft dat FFPE-weefsels op objectglasjes voor gebruik met de TSO Comprehensive (EU)-assay gedurende maximaal 4 weken (28 dagen) stabiel zijn bij kamertemperatuur. Na 4 weken (28 dagen) werd een afname van 10% in de QC-validiteit van de MSI-bibliotheek vastgesteld, toegeschreven aan een combinatie van operatorinvloed en opslagtijd. Opslag op objectglasjes gedurende 4 weken (28 dagen) resulteerde in een afname van ongeveer 29% in de ondersteunende aflezingsen voor RNA-fusies en splicevarianten.

Guardbanding titratie input nucleïnezuur

De input van nucleïnezuur voor het TSO Comprehensive (EU)-assay werd beoordeeld door DNA van 33 FFPE-monsters, bestaande uit 17 weefseltypen, te testen bij inputniveaus variërend van 10 ng tot 500 ng en door RNA van 5 FFPE-monsters, bestaande uit 5 weefseltypen, te testen bij inputniveaus variërend van 10 ng tot 85 ng. Metingen voor kwaliteitscontrole van de bibliotheek werden geëvalueerd en waren monsterafhankelijk. De DNA-resultaten lieten zien dat sommige, maar niet alle, kwaliteitscontrolemetingen van DNA-monsters reageren op een verhoogde input boven de nominale input van 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE reageerde niet op input boven 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE toonde een positieve correlatie bij verhoging van de input.
- PCT_EXON_50X nam toe bij verhogen van input tot 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES nam toe bij verhogen van input. Sommige monsters met minder dan 40 USABLE_MSI_SITES bij 40 ng voldeden aan de specificatie bij hogere inputs, waarbij een MSI-score zou kunnen worden berekend.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET nam toe bij verhogen van input.
- Bij het verhogen van de input neemt COVERAGE_MAD toe in de richting van de bovenste specificatielimiet.

Kwaliteitscontrolewaarden voor RNA-monsters namen toe (MEDIAN_INSERT_SIZE en TOTAL_ON_TARGET_READS) of af (MEDIAN_CV_GENE_500X) van 10 ng tot 40 ng maar veranderden in het algemeen niet bij een input tussen 40 ng en 85 ng.

Blancolimiet

Het percentage van fout-positieven (van het totaal aantal verwachte negatieven) werd beoordeeld aan de hand van replicaatsten van FFPE normaal of goedaardig, naastgelegen weefsel dat geen somatische varianten zou mogen bevatten van kleine DNA-varianten, genamplificaties, MSI, RNA-fusies en RNA-splicevarianten. Fout-positieven werden niet geanalyseerd voor TMB, omdat er geen klinische grenswaarde is. Zes DNA- en zes RNA-FFPE-monsters werden in duplicaat uitgevoerd door 2 operators in 3 dagen voor elk van de 2 reagenspartijen. Een subset van monsters werd opnieuw gepoold en opnieuw gesequencet in een opzet van 3x alleen DNA- en een 3x alleen RNA om het aantal fout-positieven te beoordelen met verschillende multiplexconfiguraties die worden ondersteund door dit apparaat. Daarnaast werden 30 extra RNA-monsters uitgevoerd in duplicaat die werden verwerkt met 1 reagenspartij, verdeeld tussen 2 operators. In totaal waren er 168 mogelijke observaties voor DNA en 228 observaties voor RNA, verminderd met ongeldige bibliotheken voor elk varianttype. Het percentage fout-positieven werd berekend op het genniveau voor amplificaties en op het positieniveau (ongeveer 1,9 miljoen posities) voor kleine DNA-varianten. [Tabel 46](#) toont het percentage vals-positieve resultaten voor DNA-varianttypen. Voor TSO Comprehensive (EU) zijn er geen CDx (niveau 1)-claims voor kleine DNA-varianten, waardoor er geen vals-positieve kleine DNA-varianten op niveau 1 kunnen worden gerapporteerd. De 271 fout-positieven werden genivelleerd door de TSO Comprehensive (EU) Kennisbank (Knowledge Base). Er werden geen klinisch significante fout-positieven (niveau 2) waargenomen. Er werden 4 fout-positieven op niveau 3 vastgesteld, afkomstig van 2 varianten in 4 (2,4%) van de 168 waarnemingen. Het percentage fout-positieven voor RNA-fusie en splicevarianten was 0%, zoals weergegeven in [Tabel 47](#).

Tabel 46 Fout-positieven per DNA-varianttype

Varianttype	Fout-positieven
Genamplificaties	0% (0/9912)
Kleine DNA-varianten	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	N.v.t.*

* Fout-positieven zijn niet van toepassing, omdat TMB wordt gerapporteerd als een score en geen kwalitatief resultaat heeft.

Tabel 47 Fout-positieven per RNA-varianttype

Varianttype	Fout-positieven
Fusie	0% (0/227)
Splicevariant	0% (0/227)

Detectielimiet

Er zijn twee onderzoeken uitgevoerd om de detectielimieten voor TSO Comprehensive (EU) te beoordelen. Onderzoek 1 evalueerde RET kleine DNA-varianten, RET-fusies en NTRK1–3-fusies. Onderzoek 2 evalueerde andere tumorprofielingsvarianten.

Onderzoek 1

De detectielimieten (Limits of Detection, LoD's) van NTRK1, NTRK3 en RET kleine DNA-varianten en NTRK1–3 en RET-fusies werden bepaald. De LoD is de laagste analytwaarde (bijv. variantalfrequentie of ondersteunende uitlezingen) die consistent kan worden gedetecteerd (detectielimiet 95% of een type II-fout van 5%). In het onderzoek werden FFPE-weefsels met RET kleine DNA-varianten (medullair schildkliercarcinoom), RET-fusies (papillair schildkliercardinoom, atypische Spitz-tumor) en NTRK1–3-fusies (laaggradig glioom, glioblastoma multiforme, myofibroblastisch sarcoom, sarcoom, secretoir borstcarcinoom, dikke darmcarcinoom) en een met FFPE-behandelde cellijn met NTRK1 en NTRK3 kleine DNA-varianten gebruikt. Elk monster werd verdund tot ten minste 5 testniveaus (variërend van ongeveer 0,01 – 0,10 VAF voor kleine DNA-varianten en 2 – 25 ondersteunende uitlezingen voor fusies). Er waren 18 waarnemingen voor elk testniveau per partij per variant gegenereerd door 3 operators en 3 sequencing-instrumenten die bibliotheekpreparatie initieerden op 3 niet-opeenvolgende dagen met 2 replicaten van elk monstertestniveau. Er werden twee reagenspartijen getest.

Voor DNA-varianten werden de 2 partijen onafhankelijk geanalyseerd met probit-regressie of de trefpercentagebenadering (laatste testniveau met een trefpercentage (puntenschatting) van $\geq 95\%$) om de LoD voor elke variant per partij te bepalen. De grotere LoD van de twee reagenspartijen werd genomen als detectielimiet voor de variant ([Tabel 48](#)).

Voor RNA-fusies werden FFPE-cellijnen gebruikt om de LoD-waarden te schatten voor elk fusiegen. De LoD's werden hierna geverifieerd met FFPE-weefsels met behulp van duplicaat-bibliotheekpreparaties met 3 operators, 3 instrumenten en 3 reagenspartijen om 54 observaties per variant nabij de LoD vastgesteld met FFPE-cellijnen te genereren. De geclaimde detectielimiet voor elke fusie (Tabel 49) is het laagste gemiddelde aantal ondersteunende bepalingen waarbij een trefpercentage (puntenschatting) van $\geq 95\%$ werd bereikt.

Tabel 48 Detectielimiet voor NTRK1, NTRK3 en RET kleine DNA-varianten

Markering	Chr ¹	Positie	Referentie	Alternatief	Detectielimiet (Variant-allel frequentie)
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 (deletie) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = chromosoom

² Deze DNA-varianten werden geanalyseerd met probit-regressie; de andere DNA-varianten werden geanalyseerd met de trefpercentagebenadering.

Tabel 49 Detectielimiet voor NTRK- en RET-fusies

Gen	Fusie	Detectielimiet (ondersteunende aflezingen)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
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

Onderzoek 2

De detectielimieten (LoD's) van tumorprofielingsvarianten, gerapporteerd door TSO Comprehensive (EU), werden beoordeeld. De LoD is de laagste analytwaarde (bijv. variantallelrequentie, fold change of ondersteunende aflezingsen) die consistent kan worden gedetecteerd (detectielimiet 95% of een type II-fout van 5%). FFPE-monsters van 17 weefseltypen met varianten werden verdund tot meerdere testniveaus. Per niveau werden zes waarnemingen gegenereerd door twee operators die elk een verschillende reagenspartij en instrument gebruikten.

DNA-varianten

De LoD's van 10 kleine DNA-variantklassen (25 varianten in totaal) en 2 DNA-genamplificaties (ERBB2 en MET) werden bepaald en samengevat als bereiken (Tabel 50). Omvat ook RET-varianten van de LoD van onderzoek 1. Twee van de drie inserties groter dan 5 bp hadden LoD's van 0,034 en 0,036 VAF en de derde had een LoD van 0,215 VAF. De laatste was een insertie in een gebied met lage complexiteit waarbij de insertie aanvullende herhalingen toevoegt, de uitlijning beïnvloedt en meer aflezingen voor een consistente detectie vereist. Daarom kunnen sommige genomische contexten met lage complexiteit de detectie van inserties van > 5 bp beïnvloeden.

Tabel 50 Detectielimiet voor kleine DNA-varianten en genamplificaties

Type (meet eenheid voor LoD)	Variantklasse/ genomische context	Aantal varianten	Bereik (VAF)
Kleine DNA-varianten (variant-allel frequentie)	SNV's	5	0,016–0,064
	MNV's	3	0,022–0,048
	Insertie (1-2 bp) bijna-homopolymeerherhalingen	2	0,086–0,104
	Insertie (1-2 bp) bijna-dinucleotideherhalingen	2	0,038–0,051
	Insertie (3-5 bp)	2	0,030–0,056
	Inbrengen (> 5 bp en tot 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deletie (1-2 bp) bijna-homopolymeerherhalingen	2	0,094–0,100
	Deletie (1-2 bp) bijna-dinucleotideherhalingen	2	0,033–0,070
	Deletie (3-5 bp)	2	0,028–0,064
	Deletie (> 5 en tot 25 bp)	2	0,047–0,055
Genamplificaties (fold change)	Op gen (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analyse van niet-gerichte varianten werd uitgevoerd op monsters uit Onderzoek 1 met ten minste vijf testniveaus. Elke niet-gerichte variant werd afzonderlijk geanalyseerd, en een LoD werd alleen geschat voor varianten waarvoor ten minste één niveau een slagingspercentage van > 0% en ≤ 95% had, en ten minste één niveau een slagingspercentage van ≥ 95%. Tabel 51 toont de percentielen, evenals de minimale en maximale waargenomen LoD-waarden per klasse voor de niet-gerichte varianten. De niet-gerichte varianten omvatten meer varianten per klasse dan getest in Onderzoek 2 en zijn consistent met de LoD-bereiken in Tabel 50.

Tabel 51 Samenvattende statistieken van detectielimieten per klasse van niet-gerichte varianten (uit Onderzoek 1)

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

Fusies

Er werden LoD's bepaald voor 19 fusies, goed voor 20 genen in het TSO Comprehensive (EU)-panel, die varieerden van 9 tot 31,3 ondersteunende uitlezingen (Tabel 52). In het andere onderzoek werden nog eens 3 genen (NTRK1-3) getest. Het RET-gen werd zowel hier als in het andere onderzoek getest. Zestien fusies met bepaalde LoD's hadden gegevens die consistent waren met een gemeenschappelijke LoD van 16 ondersteunende uitlezingen met behulp van een tweezijdige bovenste betrouwbaarheidsgrens (upper confidence limit, UCL) van 95%. Twee fusies hadden LoD's van 24,7 en 31,3 ondersteunende uitlezingen die niet consistent waren met de gemeenschappelijke LoD.

De fusie FGFR2-SRPK2 met een LoD-waarde van 24,7 ondersteunende uitlezingen had herhaalde overlapgebieden in het breekpunt, zoals geannoteerd door de software voor het TSO Comprehensive (EU)-assay. Herhalingsgebieden binnen een breekpunt hebben doorgaans bewijskrachtniveaus omdat aflezingen elders in het genoom kunnen voorkomen of niet-uitgelijnd kunnen blijven. Bovendien maken herhalingsgebieden het assemblageproces (dat wordt gebruikt om fusiesequenties te identificeren) moeilijker en is er extra bewijs nodig om de juiste sequentie te construeren. SEPT14-EGFR is een ander voorbeeld van een fusie met homologe sequentie in het breekpunt.

De fusie BCL2-IGHJ5 met een LoD-waarde van 31,3 ondersteunde aflezingen had een heel kort gen (IGHJ5) met het breekpunt dicht bij het begin van een exon waardoor korte uitlijningen met hiaten nodig waren. Als gevolg daarvan waren er meer aflezingen nodig voor een consistente detectie.

Tabel 52 Detectielimiet voor fusies

Fusie	Breekpunt gen A	Breekpunt gen B	LoD	Gemeenschappelijke 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

Fusie	Breekpunt gen A	Breekpunt gen B	LoD	Gemeenschappelijke LoD
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ja
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	ja
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	ja
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nee
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	nee
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	ja

Splicevarianten

De twee RNA splicevarianten MET en EGFR hadden LoDs van respectievelijk 18,7 en 16,7 ondersteunende aflezingen.

Tumorinhoud

De resultaten van het onderzoek geven aanbevelingen voor tumorinhoud voor klinische monsters. In het algemeen geldt dat hoe groter de tumorinhoud, hoe groter het 'signaal' (VAF, fold change of ondersteunende aflezingen) voor varianten in de tumor. Minimale aanbevelingen voor tumorinhoud zijn gebaseerd op de volgende waarnemingen. LoD-waarden voor kleine DNA-varianten zijn niet groter dan 0,104 VAF (met uitzondering van de TP53-insertie). Voor het detecteren van drivermutaties (met een variant-allelfrequentie van 0,50) wordt een tumorinhoud van 20% aanbevolen, zodat deze mutaties een VAF van 0,10 bereiken en op of boven de detectiegrens (LoD) liggen. Bij 20% tumorinhoud zouden genen die zijn geamplificeerd tot 5,5 fold change (11 kopieën) consistent worden gedetecteerd op basis van een detectiegrens van 1,8 fold change. Bij 20% tumorinhoud zouden fusies met 74 ondersteunende aflezingen consistent worden gedetecteerd op basis van een detectielimiet van 14,7 ondersteunende aflezingen.

Reproduceerbaarheid

Er werden twee onderzoeken uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van het TSO Comprehensive (EU)-assay te evalueren. Onderzoek 1 evalueerde RET kleine DNA-varianten naast NTRK- en RET-fusies. Onderzoek 2 evalueerde aanvullende tumorprofielingsvarianten.

Onderzoek 1

Dit onderzoek werd uitgevoerd om de reproduceerbaarheid te beoordelen van het TSO Comprehensive (EU)-assay op 3 testlocaties (1 intern, 2 extern) met 2 operators per locatie, 2 replicaten binnen één run en 3 niet-openvolgende testdagen. Er werden tests uitgevoerd met een reproduceerbaarheidspanel inclusief DNA-monsters met specifieke bekende RET kleine DNA-varianten en RNA-monsters met specifieke bekende NTRK1-3- en RET-fusievarianten van in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE)-weefsel-specimens en -cellijnen. Het panel bevatte DNA- en RNA-panelleden met lage variantniveaus en hoge variantniveaus met hetzelfde aantal panelleden op laag en hoog niveau voor elke variantklasse. Bij panelleden op hoog niveau werd gericht op ongeveer 2 tot 3 keer het LoD-niveau en bij panelleden op laag niveau werd gericht op ongeveer de LoD. Bij elke locatie testte elke operator de panelleden 3 maal in tweevoud, waarbij 6 observaties per gericht panellid werden gegenereerd. Vanaf alle 3 locaties werden 36 observaties per panellid gegenereerd (3 locaties/instrumenten × 2 operators × 2 replicaten binnen een run × 3 startdagen).

PPC's en PNC's voor gerichte kleine DNA-varianten en gerichte RNA-fusievarianten op hoog niveau werden berekend als primaire eindpunten. PPC's en PNC's voor gerichte kleine DNA-varianten en gerichte RNA-fusievarianten op laag niveau werden berekend als secundaire eindpunten. Tweezijdige 95% betrouwbaarheidsintervallen (BI's) geassocieerd met alle eindpunten werden berekend met behulp van de Wilson-scoremethode. Er werden primaire analyses uitgevoerd om PPC en PNC te schatten (met bijbehorende BI's van 95%) bij gerichte panelleden van hoog niveau door observaties van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor een bepaald doel in een groep panelleden die de van toepassing zijnde variantklasse vertegenwoordigen (zoals kleine DNA-varianten en RNA-fusies) te combineren tussen locaties/instrumenten, operators en runs. Voor elke doelvariant werden observaties van het TSO Comprehensive (EU)-assay bij andere panelleden op hoog niveau die gericht waren op hetzelfde varianttype, maar niet dezelfde variant bevatten als bepaald door de meerderheidsregel, gecombineerd tot het berekende PNC. Het totale PPC en PNC voor de gerichte panelleden van laag niveau werden op een soortgelijke manier vastgesteld.

RET kleine DNA-varianten

Voor de panelleden met een klein DNA-variant op hoog niveau was het totale PPC 100,0% (207/207; 95% BI: 98,2% tot 100,0%) (Tabel 53). Het totale PNC voor de panelleden met een kleine DNA-variant op hoog niveau was 100,0% (1035/1035; 95% BI: 99,6% tot 100,0%) (Tabel 54). Voor panelleden met gerichte kleine DNA-varianten op laag niveau was het totale PPC voor de panelleden met gerichte kleine DNA-varianten op laag niveau 99,1% (210/212; 95% BI: 96,6% tot 99,7%), en het totale PNC was 100,0% (1026/1026; 95% BI: 99,6% tot 100,0%).

Tabel 53 PPC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van RET kleine DNA-varianten bij gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Varianttype	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (aminozuur)	N	Gemiddelde VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95% BI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0%)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0%)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alle kleine DNA varianten hoog	Alle kleine DNA varianten hoog	Alle kleine DNA varianten hoog	207	N.v.t. ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alle kleine DNA varianten laag	Alle kleine DNA varianten laag	Alle kleine DNA varianten laag	212	N.v.t. ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Afkortingen: N.v.t., niet van toepassing; VAF, variantalfrequentie.

² 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 54 PNC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van RET kleine DNA-varianten bij gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Varianttype	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (aminozuur)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% BI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Deletie	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Alle kleine DNA varianten hoog	Alle kleine DNA varianten hoog	Alle kleine DNA varianten hoog	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Deletie	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Alle kleine DNA varianten laag	Alle kleine DNA varianten laag	Alle kleine DNA varianten laag	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Alle waarnemingen die zijn samengevoegd uit combinaties van panelleden en varianten waarvoor de meerderheid negatief is (gerichte varianten met daarin fusies waarbij minder dan 50% van de bepalingen positief zijn).

² 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 55 toont de variantiecomponentenanalyse van variantallelfrequenties (VAF's) over de ongeveer 36 observaties voor elk panellid. De standaarddeviatie (SD) en procentuele variatiecoëfficiënt (%CV; totaal en voor elke bron) werden berekend en worden voor elke RET kleine DNA-doelvariant getoond.

Tabel 55 TSO Comprehensive (EU) Analyse van de assayvariantiecomponenten van VAF bij gerichte panelleden met kleine DNA-varianten

Variantniveau	Varianttype	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (Aminozuur)	N	Gemiddelde VAF	Locatie SD (%CV)	Operator SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Replicaat SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Deletie	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)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Deletie	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)
	Insertie	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 en RET-fusies

Bij de RNA-fusiepanelleden van het hoge niveau was de totale PPC 99,3% (285/287; 95% BI: 97,5% tot 99,8%) (Tabel 56). Het PPC was 100% voor alle panelleden van hoog niveau met uitzondering van het BCAN-NTRK1-panellid (PPC = 94,4% [34/36; 95% BI: 81,9% tot 98,5%]). Het totale PNC voor de RNA-fusiepanelleden van hoog niveau was 100,0% (1724/1724; 95% BI: 99,8% tot 100,0%) (Tabel 57). Voor de gerichte RNA-fusiepanelleden van laag niveau was het totale PPC 95,4% (272/285; 95% BI: 92,3%, 97,3%) en het totale PNC was 100,0% (1851/1851; 95% BI: 99,8% tot 100,0%).

Tabel 56 PPC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van NTRK- en RET-fusies bij gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Gerichte fusie	N	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen	PPC (%) (n/N)	95% BI*
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Alle fusies hoog	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Alle fusies laag	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval (BI) berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 57 PNC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van NTRK- en RET-fusies bij niet-gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Gerichte fusies	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% BI ²
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Alle fusies - Hoog	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Alle fusies - Laag	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Alle waarnemingen die zijn samengevoegd uit combinaties van panelleden en varianten waarvoor de meerderheid negatief is (gerichte varianten met daarin fusies waarbij minder dan 50% van de bepalingen positief zijn).

² 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval (BI) berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 58 toont de variantiecomponentenanalyse van ondersteunende bepalingen tussen de ongeveer 36 observaties binnen elke gerichte fusie. De SD en het %CV (totaal en voor elke bron) werden berekend en gepresenteerd voor elke gerichte fusie.

Tabel 58 TSO Comprehensive (EU) Analyse van de variantiecomponenten met ondersteunende uitlezingen bij gerichte panelleden voor RNA-fusie

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

Onderzoek 2

Er werd een tweede onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van het TSO Comprehensive (EU)-assay te beoordelen op 3 testlocaties (2 extern en 1 intern), 2 operators/instrumenten per locatie, 3 unieke reagenspartijen, 4 testdagen (niet-opevolgend) en 2 sequencing-runs per monsterbibliotheek.

De tests werden uitgevoerd met geëxtraheerde DNA- en RNA-monsters van 41 FFPE-weefselspecimens en 1 FFPE-celijn (met 1 FFPE-weefselspecimen en de FFPE-celijn gebruikt om voor elk 2 panelleden te creëren). Weefselspecimens bestonden uit de volgende typen: blaas, bot, hersenen, borst, dikke darm, jejunum, nier, lever, long, eierstok, prostaat, huid, zacht weefsel, maag, schildklier en baarmoeder. Er werden in totaal 44 panelleden getest, waaronder DNA-panelleden met kleine DNA-varianten (SNV's, MNV's, inserties en deleties), genamplificaties, verschillende TMB-scores, hoge MSI-scores en RNA-panelleden met fusies en splicevarianten. De meeste panelleden hadden bekende doelvarianten bij niveaus van ongeveer 2 tot 3 keer de variant specifieke detectielimiet (~ 2-3 × LoD).

De LoD is de analytconcentratie waarbij waargenomen assayresultaten ≥ 95% van de tijd positief zijn (variant gedetecteerd ten opzichte van de grenswaarde van het TSO Comprehensive (EU)-assay). De gemiddelde

waargenomen variantniveaus werden gecategoriseerd als ongeveer $<2 \times \text{LoD}$ (waargenomen variantniveaus bij $< 1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$ (waargenomen variantniveaus bij $1,5 \times \text{LoD}$ tot $3,4 \times \text{LoD}$) en ongeveer $> 3 \times \text{LoD}$ (waargenomen variantniveaus bij $> 3,4 \times \text{LoD}$).

PPC's voor kleine DNA-varianten, genamplificaties, MSI-hoog en RNA-varianten werden berekend door observaties tussen sequencing-runs en locaties te combineren. PNC's werden op dezelfde manier berekend voor kleine DNA-varianten, genamplificaties en RNA-varianten. Voor elke bekende doelvariant waren er observaties van het TSO Comprehensive (EU)-assay bij panelleden van hetzelfde varianttype, maar met andere varianten die niet waren afgeleid van hetzelfde biospecimen en die niet voldeden aan de meerderheidsregel voor die variant (d.w.z. $< 50\%$ van de bepalingen waren positief). Om het PNC te berekenen werden die gecombineerd tussen locaties, operators/instrumenten, dagen, reagenspartijen en sequencing-runs. Tweezijdige 95% betrouwbaarheidsintervallen (BI's) werden berekend met behulp van de Wilson-scoremethode.

Kleine DNA-varianten

Tabel 59 toont PPC's voor gerichte kleine DNA-varianten. PPC's varieerden van 91,3% voor een BRAF SNV tot 100% voor de meerderheid van kleine DNA-varianten.

Tabel 59 PPC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van kleine DNA-varianten bij gecombineerde gerichte panelleden

Waargenomen variantniveau ¹	Varianttype	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (aminozuur)	Gemiddelde VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% BI ³
$\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$	DELETIE	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$	DELETIE	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$	INSERTIE	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
$\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$	INSERTIE	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	INSERTIE	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
$\sim 2\text{-}3 \times \text{LoD}$	DELETIE	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Waargenomen variantniveau ¹	Varianttype	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (aminozuur)	Gemiddelde VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% BI ³
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	DELETIE	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12D	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELETIE	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INSERTIE	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variantniveau berekend aan de hand van gemiddelde waargenomen variantallelfrequentie.

² Gemiddelde variantallelfrequentie berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.

³ 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

PNC's waren 100% bij kleine DNA-varianten.

Tabel 60 toont de variantiecomponentanalyse van VAF-resultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden met gerichte kleine DNA-varianten.

Tabel 60 Analyse van de variantiecomponenten van VAF voor gerichte kleine DNA-varianten

Doelvariant (nucleotide)	N	Gemiddelde VAF	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal 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)

Er waren twee kleine DNA-doelvarianten waarvoor het aantal observaties te klein was voor het toepassen van een variantiecomponentenmodel. Bij deze twee doelvarianten waren de totale SD's 0,027 voor variant chr1_27024001_C_CG en 0,001 voor variant chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genamplificaties

Tabel 61 toont PPC's voor gerichte genamplificaties. PPC's waren 100,0% voor MET en 100,0% voor ERBB2.

Tabel 61 PPC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van genamplificaties bij gecombineerde gerichte panelleden

Waargenomen variantniveau ¹	Doelvariant	Gemiddelde waargenomen fold-change ²	Percentage positieve bepalingen (%)	95% BI ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Variantniveau berekend aan de hand van gemiddelde waargenomen fold-change.

² Gemiddelde fold-change berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.

³ 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

De PNC's waren 100% bij genamplificaties.

Tabel 62 toont de variantiecomponentanalyse van fold-change-resultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden met gerichte genamplificaties.

Tabel 62 Analyse van de variantiecomponenten van fold-change voor gerichte genamplificaties

Doelvariant	N	Gemiddelde fold-change	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal 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

Tabel 63 toont PPC's voor gerichte MSI-hoog-panelleden. PPC's waren 100% voor beide MSI-hoog-panelleden.

Tabel 63 PPC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van de MSI-hoog-status bij gecombineerde gerichte panelleden

Panellid	Gemiddelde MSI-score ¹	N	Percentage positieve bepalingen (%)	95% BI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Alle leden		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Gemiddelde waargenomen MSI-score berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.

² 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 64 toont de variantiecomponentanalyse van MSI-scoreresultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden gericht op MSI-hoog-status.

Tabel 64 Analyse van de variantiecomponenten van MSI-score bij gerichte MSI-hoog-panelleden

Panellid	N	Gemiddelde MSI-score	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal 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

Ter beoordeling van de reproduceerbaarheid van TMB-scores werd een kwantitatieve analyse van de score uitgevoerd bij gerichte TMB-panelleden, wat een bereik van verwachte TMB-scores vertegenwoordigde. Tabel 65 toont de variantiecomponentanalyse van TMB-scoreresultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij de TMB-panelleden. De totale SD's van de TMB-score waren 1,0 (%CV = 13) voor één panellid (gemiddelde TMB-score = 7,6) en 1,1 (%CV = 2) voor een ander panellid (gemiddelde TMB-score = 63,2).

Tabel 65 Analyse van de variantiecomponenten van de TMB-score voor gerichte TMB-panelleden

Panellid*	N	Gemiddelde TMB-score	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal 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)

* Er was 1 TMB-panellid waarvoor het aantal observaties te klein was (N = 2) voor het toepassen van een variantiecomponentenmodel. Voor dit panellid was de totale SD 1,7.

RNA-varianten

Tabel 66 toont PPC's voor gerichte RNA-varianten. De PPC's varieerden van 91,7% voor KIF5B-RET tot 100% voor de meeste RNA-varianten.

Tabel 66 PPC van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van RNA-varianten bij gecombineerde gerichte panelleden

Waargenomen variantniveau ¹	Varianttype	Doelvariant	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen ²	PPC (%) (n/N)	95% BI ³
> 3x LoD	Fusie	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusie	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusie	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusie	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusie	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusie	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusie	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3 x LoD	Fusie	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusie	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusie	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusie	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusie	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusie	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusie	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Fusie	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fusie	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Splice variant	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3 x LoD	Splice variant	MET exon 14-skipping	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variantniveau berekend aan de hand van gemiddelde waargenomen ondersteunende uitlezingen.

² Gemiddelde ondersteunende uitlezingen berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.

³ 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

PNC was 100% voor elke gerichte RNA-variant, behalve voor de FGFR2-SRPK2-fusie (PNC = 99,60% (984/988; 95% BI: 98,96% tot 99,84%).

Tabel 67 toont de variantiecomponentanalyse van ondersteunende uitlezingsresultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden met gerichte RNA-varianten.

Tabel 67 Analyse van de variantiecomponenten van ondersteunende uitlezingen voor gerichte RNA-varianten

Doelvariant	N	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal 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-skipping splicevariant	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Intralaboratoriumprecisie

Er zijn twee onderzoeken uitgevoerd om de intralaboratoriumprecisie voor TSO Comprehensive (EU) te evalueren. Onderzoek 1 evalueerde NTRK- en RET-fusies en RET kleine DNA-varianten. Onderzoek 2 evalueerde TMB en MSI.

Onderzoek 1

De intralaboratoriumprecisie werd geëvalueerd voor NTRK1-3-fusies (glioom van lagere graad, glioblastoma multiforme, myofibroblastisch sarcoom, secretoire borstkanker), RET-fusies (schildklierkanker en huidweefsel van een onbekende kanker) en RET kleine DNA-varianten (medullaire schildklierkanker) met FFPE-weefsels van de aangegeven kankers. Elk monster werd getest bij twee variantniveaus: ~1 x LoD (laag variantniveau) en ~2-3

x LoD (hoog variantniveau) met de uitzondering van het monster met daarin CCDC6-RET, wat alleen werd getest op het lage variantniveau. Alle monsters werden op elk testniveau uitgevoerd in duplicaten in elke bibliotheekpreparatiecyclus door drie (3) operators. Elke operator begon de bibliotheekpreparatie op drie (3) niet-achtereenvolgende startdagen en sequencete op drie (3) aangewezen NextSeq 550Dx-instrumenten. Er werden drie (3) reagenspartijen getest, waarbij 54 observaties per niveau werden gegenereerd. Sommige niveaus hadden minder dan 54 observaties als gevolg van ongeldige bibliotheken.

Kwalitatieve analyse

De kwalitatieve concordantie van het bepalen van varianten werd apart geëvalueerd voor de twee variantniveaus voor een gegeven variant uit gepoolde waarnemingen over alle variabelen (operators, reagenspartijen, instrumenten, dagen en replicaten). PPCs en PNC's en het bijbehorende tweezijdige betrouwbaarheidsinterval van 95% (Wilson-score) worden samengevat in [Tabel 68](#) (kleine DNA-varianten) en [Tabel 69](#) (RNA-fusies).

Bij het hoogste variantniveau (~2-3x LoD) toonde het TSO Comprehensive (EU)-assay 100% voor PPC en PNC aan bij alle geteste varianten.

Bij het lage variantniveau (~1x LoD) varieerde de PPC voor kleine DNA-varianten van 83,3% tot 98,1% en de PPC voor RNA-fusies van 90,7% tot 100%. Voor varianten met een PPC < 95% lagen de gemiddelde VAF's (RET C634Y en RET D898_E901del) of ondersteunende uitlezingen (NCOA4-RET en BCAN-NTRK1) onder de respectievelijke detectielimieten. Bij het lage variantniveau werd 100% PNC bereikt voor alle varianten.

Tabel 68 Kwalitatieve resultaten voor gerichte DNA-varianten

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

Variantniveau	Variant	Varianttype	Gemiddelde VAF	PPC (%) (n/N) (95% BI)	PNC (%) (n/N) (95% BI)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELETIE	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*	DELETIE	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Voor elke variant in de paragraaf Detectielimieten worden nucleotideveranderingen vermeld, behalve voor RET D631_L633delinsE, wat Chromosoom 10, Positie 43609940, Referentie ACGAGCT, Alternatief A is.

Tabel 69 Kwalitatieve resultaten voor gerichte RNA-fusies

Variantniveau	Fusie	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen	PPC (%) (n/N) (95% BI)	PNC (%) (n/N) (95% BI)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE-cel lijn)	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 (monster 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (monster 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Variantniveau	Fusie	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen	PPC (%) (n/N) (95% BI)	PNC (%) (n/N) (95% BI)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE -cellijn)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	N.v.t.	Niet getest	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (monster 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (monster 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kwantitatieve analyse

Er werd analyse uitgevoerd op REML-variantiecomponenten om de totale variatie van de onderliggende continue variabele (VAF voor kleine DNA-varianten en ondersteunende uitlezingen voor RNA-fusies) te evalueren en de componenten van de precisie [standaarddeviatie (SD), variatiecoëfficiënt (CV)] te schatten voor elke bron van variatie [operators, instrumenten, dagen, reagenspartijen, resterend en totaal]. De resultaten worden gepresenteerd in de [Tabel 70](#) voor kleine DNA-varianten en in de [Tabel 71](#) voor RNA-fusies.

De variatie in VAF nam toe met het gemiddelde, zoals verwacht voor een binomiaal aandeel. De variatie bij ondersteunende uitlezingen nam toe met het gemiddelde zoals verwacht bij tellingsgegevens. De resterende component was de grootste bijdrager aan de totale variantie voor zowel kleine DNA-varianten als RNA-fusies op beide niveaus, wat de conclusie ondersteunt dat detectie van deze varianten door TSO Comprehensive (EU) robuust is voor operators, partijen, instrumenten en dagen.

Tabel 70 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten voor gerichte kleine DNA-varianten

VAF-niveau	Variant	Varianttype	N geldige pogingen	Gemiddelde VAF	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELETIE	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	DELETIE	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
~3x LoD	RET D898_E901del	DELETIE	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	DELETIE	52	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

Tabel 71 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten voor gerichte kleine RNA-fusies

Niveau ondersteunende uitlezingen	Fusie	N geldige pogingen	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (cellijn)	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 (monster 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (monster 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Niveau ondersteunende uitlezingen	Fusie	N geldige pogingen	Gemiddelde ondersteunende uitlezingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (cellijn)	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 (monster 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (monster 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Onderzoek 2

De intralaboratoriumprecisie werd geëvalueerd voor TMB en MSI. Er werden vijf NSCLC FFPE DNA-monsters voor TMB en zeven CRC FFPE-monsters voor MSI, waaronder zowel MS-Stabiel als MSI-hoog, gebruikt om de precisie te evalueren op verschillende niveaus binnen het scorebereik. Alle monsters werden in duplicaat gerund door drie (3) operators, op drie (3) dagen, met drie (3) bibliotheekpreparaties voor drie (3) reagenspartijen met behulp van drie NextSeq 550Dx-instrumenten die 54 observaties per niveau genereerden. Kwalitatieve concordantie werd geëvalueerd voor MSI-status. Het TSO Comprehensive (EU)-assay toonde 100% concordantie aan voor percentage positieve bepalingen en percentage negatieve bepalingen bij de MSI-status. Voor TMB meldt het TSO Comprehensive (EU)-assay een TMB-score; kwalitatieve concordantie is niet van toepassing.

De totale variatie van TMB- en MSI-scores, samen met de bijdrage per bron (instrumenten, operators, partijen, dagen en resterend), werd gekwantificeerd met behulp van een variantiecomponentenmodel bij verschillende scores. De standaarddeviatie (SD) en variatiecoëfficiënt (CV) worden gepresenteerd in [Tabel 72](#) voor TMB en [Tabel 73](#) voor MSI, per niveau. Sommige niveaus hadden minder dan 54 observaties als gevolg van ongeldige bibliotheken.

Tabel 72 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten TMB-score

Niveau	Gemiddelde TMB-score	N geldige pogingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal 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)

Niveau	Gemiddelde TMB-score	N geldige pogingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabel 73 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten MSI-score

MSI-status	Niveau	Gemiddelde MSI-score (%)	N geldige pogingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
MS-stabiel	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-hoog	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)

De variatie in TMB-scores heeft de neiging toe te nemen met het gemiddelde zoals verwacht op grond van de theoretische distributies van tellingsgegevens. De variatie in MSI-scores voor niveaus in de buurt van MSI-score = 50 is groter dan de variatie van MSI-scores dicht bij 0 of 100, overeenkomstig de variabiliteit van theoretische distributies van verhoudingsgegevens. De resterende component bleef de grootste bijdrager aan de totale variantie voor zowel MSI- als TMB-scores, wat de conclusie ondersteunt dat de scores robuust zijn voor operators, partijen, instrumenten en dagen. Zowel MSI als TMB zijn echter complexe biomarkers en de analytische prestaties kunnen per monster verschillen. Dat wil zeggen, TMB-variatie is niet alleen afhankelijk van de TMB-waarde maar ook van de samenstelling van varianten in het monster, zoals varianttype (SNV, Indel) en VAF-niveau (nabijheid tot inclusiegrenswaarde). Evenzo is de MSI-variatie niet alleen afhankelijk van de MSI-waarde maar ook van de samenstelling van de locaties in het monster, zoals het aantal locaties dat instabiel is en de mate van instabiliteit per locatie.

C5- en C95-waardes rond de grenswaarde van 20,00% werden vastgesteld voor MSI aan de hand van een precisieprofiel (Tabel 74).

Tabel 74 C5-C95-interval voor MSI

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

De impact van tumorinhoud op TMB- en MSI-scores werd geëvalueerd. Bij de meeste monsters had een tumorinhoud van $\geq 30\%$ een verwaarloosbare invloed op TMB-scores boven ongeveer 10 mutaties per megabase. TMB-scores bleven relatief onveranderd met toenemende tumorinhoud. Bij MSI-hoog-monsters vertoonde de tumorinhoud een positieve, lineaire correlatie met de MSI-score. MSI-hoog-monsters bleven gemiddeld MSI-hoog als de tumorinhoud $\geq 30\%$ was. Endometriale monsters gedroegen zich opvallend anders dan de andere weefseltypen en bleken een grotere hoeveelheid tumorinhoud nodig te hebben om MSI-hoog te kunnen worden genoemd.

Nauwkeurigheid bij tumorprofilering

De detectie van varianten door het TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van referentiemethoden. Kleine DNA-varianten en TMB werden vergeleken met een extern gevalideerde hele exoom, next-generation sequencing NGS-methode. Genamplificaties werden vergeleken met dezelfde whole exome NGS methode of gevalideerde Dual In-Situ Hybridization (DISH-)methode voor HER2-amplificaties. MSI werd geëvalueerd tegen een gevalideerde MSI-PCR-test. RNA-splicevarianten werden vergeleken tegen een gevalideerde kwantitatieve PCR-methode (qPCR). ROS1- en ALK-fusies werden vergeleken tegen gevalideerde FISH-assays. Alle andere fusies werden vergeleken met een samengestelde methode, die bestaat uit een gevalideerd RNA whole exome NGS-assay (RNGS1), een gericht NGS-panel (RNGS2) en ddPCR (druppelsgewijze digitale PCR).

Detectie van kleine DNA-varianten

De detectie van kleine DNA-varianten door het TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van WES (whole exome sequencing, sequencing van het hele exoom) waarbij WES wordt gebruikt bij gematchte tumor-normaal monsterparen voor het bepalen van de kiemlijn en somatische kleine varianten. De vergelijking tussen kleine varianten, bestaande uit single nucleotide varianten (SNV's), inserties en deleties, was gebaseerd op 124 monsters van 14 verschillende weefseltypen die zowel TSO Comprehensive (EU) voor WES als voor beide geldig waren. TSO Comprehensive (EU) maar niet de WES-assay kan multi-nucleotide varianten (MNV's, 2-3 bp) detecteren, waarvoor fasering nodig is. TSO Comprehensive (EU) MNV's werden geëvalueerd als individuele SNV's tegen WES. Een samenvatting van concordantie op variantniveau, inclusief PPA (Positive Percent Agreement) en NPA (Negative Percent Agreement) voor alle variantbepalingen wordt weergegeven in [Tabel 75](#).

Tabel 75 Samenvatting van de concordantie voor kleine variantbepalingen, geëvalueerd met de kiemlijn of de somatische status

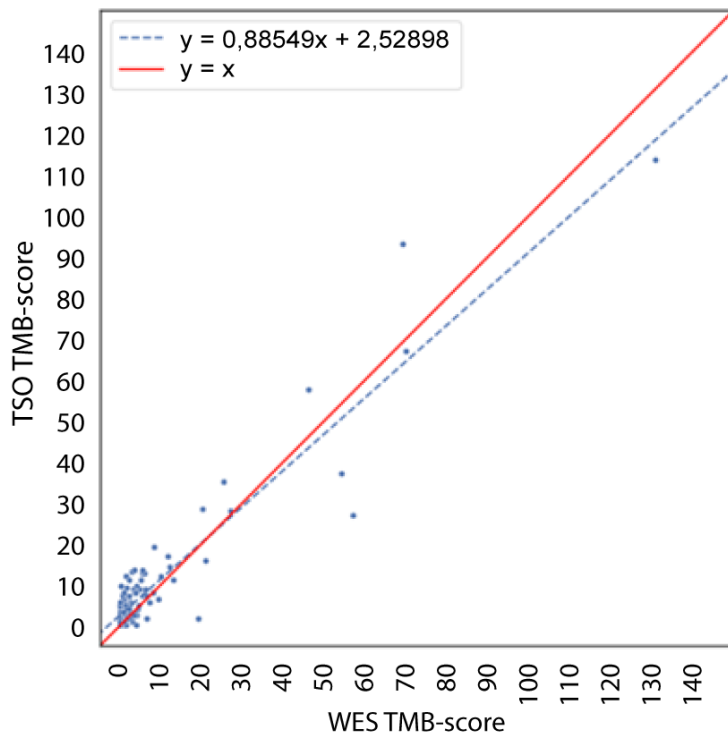
	WES Somatic bepaald	WES Germline bepaald	WES niet bepaald
TSO Comprehensive (EU) Bepaald	382	33.163	426
TSO Comprehensive (EU) Niet bepaald	69	61	70.000.481
Totaal	451	33.224	70.000.907
Percentage overeenkomst	PPA: 85% (382/451), 95% BI: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33.163/33.224) 95% BI: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70.000.481/70.000.907) 95% BI: [99,999%, 99,999%]

In totaal bepaalde TSO Comprehensive (EU) 426 varianten die niet werden gedetecteerd met de WES-methode. 204 van deze varianten (48%) hadden variantallelfrequenties onder de drempelwaarde voor bepaling bij de WES-methode. Bij de resterende mogelijke fout-positieve varianten was er bewijs van de variantbepaling bij de WES-methode met lage ondersteuning. Bovendien hadden veel van de varianten een zeer laag niveau van WES-bewijs in de gematchte normale monsters. Dit resultaat suggereert dat deze varianten in de tumor door WES werden gemist vanwege tumor-in-normaal-besmetting.

Detectie tumormutatiebelasting

De TMB-concordantie werd bepaald door het vergelijken van de TMB-scores (somatische mutaties/megabasis) tussen de WES-methode en TSO Comprehensive (EU) voor 124 monsters met beschikbare gegevens van zowel TSO Comprehensive (EU) als WES. Lineaire regressieanalyse met WES als predictor had een y-snijpunt van 2,53, een curve van 0,89 en een Pearson's-correlatiecoëfficiënt van 0,94 ([Afbeelding 3](#)).

Afbeelding 3 Correlatie van de TMB-score tussen WES en TSO Comprehensive (EU)



Detectie van genamplificatie

De detectie van genamplificaties door het TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van hetzelfde WES-array waarbij gebruik werd gemaakt van ofwel monsters die overeenkwamen met tumor-normaal of monsters met alleen een tumor. In totaal waren er 420 monsters, waarvan 183 de orthogonale tumor-normale methode gebruikten en 237 de methode van alleen tumor. Van de 420 monsters werden er 50 geselecteerd voor het onderzoek omdat ze positief waren voor amplificatie met TSO Comprehensive (EU) of een eerdere assay. De prestaties voor deze gekarakteriseerde monsters zijn aangepast op basis van de gemiddelde fusieprevalentie. Voor de gecombineerde prestaties van gekarakteriseerde en niet-gekarakteriseerde monsters werd een gewogen gemiddelde op basis van inverse variantie gebruikt. De monsters waren van 14 weefseltypen en bevatten amplificaties van 55 genen. TSO Comprehensive (EU) rapporteert genamplificaties van de MET- en ERBB2-genen. De nauwkeurigheid werd echter beoordeeld voor alle 55 genen. In [Tabel 76](#) vindt u een overzicht van de genamplificatiebepalingen.

Tabel 76 Samenvatting van de concordantie bij genamplificaties

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

* Betrouwbaarheidsinterval berekend door bootstrap.

ERBB2-(HER2-)amplificaties in maag- en borstweefsel werden gescheiden van andere genamplificaties geanalyseerd met een Dual In-Situ Hybridization-methode (DISH-methode). In totaal werden 116 borst- en maagmonsters getest, waarvan 64 eerder werden gekenmerkt als HER2-positief met IHC of FISH. Eén monster kon niet worden geëxtraheerd, 4 monsters waren niet geldig voor TSO Comprehensive (EU) en 3 monsters waren niet geldig voor het DISH-assay. Van de 108 monsters behaalden er 20 (18,5%) een score rond de DISH-grenswaarde van 2,0 (tussen 1,5 en 2,5). Concordantieresultaten, waaronder PPA, NPA voor alle monsters alsmede uitgesloten grensgevallen voor HER2 DISH worden weergegeven in [Tabel 77](#).

Tabel 77 Een samenvatting van concordantie tussen TSO Comprehensive en HER2 DISH, inclusief voor HER2-genamplificatie

HER2-genamplificatie Alles (borst en maag)	HER2 DISH geamplificeerd	HER2 DISH niet-geamplificeerd
TSO Comprehensive (EU) Positief	17 (inclusief 1 grensgeval)	13 (inclusief 1 grensgeval)
TSO Comprehensive (EU) Negatief	10 (inclusief 6 grensgevallen)	68 (inclusief 12 grensgevallen)
Percentage overeenkomst inclusief grensgevallen	PPA: 63% (17/27) 95% BI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% BI: [74%, 90%]
Percentage overeenkomst buiten de grensgevallen	PPA: 80% (16/20) 95% BI: [58%; 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% BI: [72%, 90%]

Detectie microsatellietinstabiliteit

De detectie van microsatellietinstabiliteit door het TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van een gevalideerde MSI-PCR-test waarbij voor de tests gebruik werd gemaakt van tumor-normaal gematchte monsters. In totaal werden 195 monsters geanalyseerd die voldeden aan de vereiste van $\geq 30\%$ tumorinhoud (voor de MS-stabiele status) en afkomstig waren uit 14 verschillende weefseltypen. MSI-PCR evalueert 5 locaties en geeft drie mogelijke resultaten: MSI-stabiel (geen instabiele locaties), MSI-laag (één instabiele locatie) en MSI-hoog (twee of meer instabiele locaties). TSO Comprehensive (EU) evalueert tot 130 microsatellietlocaties en classificeert monsters uitsluitend als MS-stabiel of MSI-hoog ($\geq 20\%$ instabiele locaties). MSI-laag werd gegroepeerd bij de MS-stabiele resultaten voor MSI-PCR. Concordantieanalyse wordt getoond in [Tabel 78](#).

Tabel 78 Samenvatting van de concordantieanalyse tussen TSO Comprehensive (EU) en MSI-PCR voor DNA-microsatellietinstabiliteit

MSI-status	PCR MSI-hoog	PCR MSI-laag	PCR MSI-stabiel
TSO Comprehensive (EU) instabiel (MSI-hoog)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) stabiel (MS-stabiel)	3	0	150
Totaal	44	2	150
Percentage overeenkomst	PPA: 93% (41/44) 95% BI: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% BI: [95%, > 99%]	

Detectie van RNA-splicevarianten

De nauwkeurigheid van de detectie van splicevarianten werd berekend door de TSO Comprehensive (EU)-resultaten te vergelijken met qPCR-assays voor EGFRvIII en MET exon 14-skipping, met inbegrip van één bekende positieve RNA voor elk van deze splicevarianten. Er werd een concordantieanalyse uitgevoerd op in totaal 230 unieke FFPE RNA-monsters van 14 weefseltypen met beschikbare gegevens van zowel TSO Comprehensive (EU) als de referentiemethode. Alle monsters werden respectievelijk getest op MET exon 14-skipping, terwijl EGFRvIII alleen in hersenweefsel werd getest. Drie monsters die met qPCR positief werden bepaald voor MET exon 14-skipping, maar niet met TSO Comprehensive (EU) hadden gemiddeld een Ct > 37 en lagen onder het TSO Comprehensive (EU) LoD-niveau. [Tabel 79](#) is een samenvatting van de resultaten van het concordantieonderzoek.

Tabel 79 Samenvatting van de concordantieanalyse tussen TSO Comprehensive (EU) en het qPCR-assay voor RNA-splicevarianten

RNA-splicevarianten	qPCR-positief	qPCR negatief
TSO Comprehensive (EU) Positief (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negatief (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Positief MET exon 14-skipping	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negatief MET exon 14-skipping	3	217
Totaal	7	230
Percentage overeenkomst	PPA: 57% (4/7) 95% BI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% BI: [98%, 100%]

Detectie RNA-fusie

Vergelijking met een samengestelde methode

TSO Comprehensive (EU)-fusies werden vergeleken met een samengestelde methode bestaande uit whole-exome RNA-sequencing met een NGS-panel (RNGS1), een gericht NGS-fusiepanel (RNGS2) en droplet digital PCR (ddPCR).

De RNGS1-methode overlapt met alle genen waarvoor TSO Comprehensive (EU) fusies kan detecteren. De detectielimiet van de RNGS1-methode was echter 4x tot 8x die van TSO Comprehensive (EU), gebaseerd op het aantal ondersteunende uitlezingen die werden waargenomen in de overlappende fusiebepalingen. Daarom werd voor fusies een samengestelde methode van twee aanvullende methoden met grotere gevoeligheid maar minder breedte gebruikt in combinatie met de WES (RNGS1)-methode.

In totaal werden er 255 unieke RNA-monsters, die 14 weefseltypen vertegenwoordigen en voldoen aan de TSO Comprehensive (EU)-metingen, getest met RNGS1. Twee monsters waren ongeldig voor de kwaliteitscontrole van RNGS1-monsters en werden uitgesloten van aanvullende analyse. Van de 82 fusies die werden bepaald met TSO Comprehensive (EU) werden er 4 uitgesloten van evaluatie als gevolg van fouten in de kwaliteitscontrole van RNGS1-monsters; ook konden 7 aanvullende fusies niet worden bepaald door de afwezigheid van de doelen in het RNGS1-panel. Van de resterende 71 fusies die werden bepaald met TSO Comprehensive (EU) werden 9 fusies bevestigd met RNGS1. RNGS1 bepaalde 4 fusies die niet werden bepaald met TSO Comprehensive (EU).

Van de 62 fusies die TSO Comprehensive (EU)-positief waren en niet werden gedetecteerd door RNGS1, overlaptten er 13 met en werden bevestigd door RNGS2. Eén fusie werd bepaald met RNGS2 maar niet bepaald met TSO Comprehensive (EU).

Vervolgens werd druppelsgewijze digitale PCR gebruikt voor fusies die door TSO Comprehensive (EU) werden bepaald, maar niet werden bepaald of niet te bepalen waren met RNGS1 en niet te evalueren waren met RNGS2 (49). Aanvullend werd ddPCR gebruikt voor het opnieuw evalueren van 2 van de 4 fout-positieve fusies voor TSO Comprehensive (EU) met RNGS1 en 2 van 9 concordante fusies voor TSO Comprehensive (EU) en RNGS1. Er werden vijf fusie-negatieve monsters opgenomen bij het testen van elk positief fusiemonster om de specificiteit te waarborgen. Achttien fusies werden niet getest met ddPCR omdat er geen primers/probes ontworpen konden worden, vanwege meerdere genpartners voor de fusie of vanwege onvoldoende resterend FFPE-materiaal. Voor ddPCR zijn primers en probes ontworpen tegen de waargenomen breekpunten in het TSO Comprehensive (EU)-assay.

In totaal werden 52 fusies gedetecteerd door ddPCR, waarvan 41 werden bepaald door TSO Comprehensive (EU) maar niet werden bepaald of niet te bepalen waren met RNGS1. Negen fusies werden bepaald met ddPCR maar waren negatief met TSO Comprehensive (EU) of RNGS1. Twee ddPCR-positieve fusies bevestigden de 2 concordante fusies voor TSO Comprehensive (EU) en RNGS1. Er werd geen fusie gedetecteerd door ddPCR voor de twee opnieuw geëvalueerde TSO Comprehensive (EU) fout-negatieven met RNGS1; deze werden echter geteld als fout-negatieven op basis van de vergelijking met RNGS1.

Van de 255 monsters werden er 35 geselecteerd voor het onderzoek op basis van een positieve fusiedetectie met TSO Comprehensive (EU) of een eerdere assay. De prestaties voor deze gekarakteriseerde monsters zijn aangepast op basis van de gemiddelde fusieprevalentie. Voor de gecombineerde prestaties van gekarakteriseerde en niet-gekarakteriseerde monsters werd een gewogen gemiddelde op basis van inverse variantie gebruikt. De samengestelde concordantieresultaten voor fusies worden weergegeven in [Tabel 80](#).

De 66 fusies (54 unieke fusies) die concordant waren met de samengestelde methode vertegenwoordigden 43 genen in het TSO Comprehensive (EU)-panel. Fusies komen echter alleen in aanmerking voor rapportage als het gaat om de 23 genen die in [Tabel 80](#) worden vermeld.

Tabel 80 Samenvatting van concordantie voor RNA-fusies

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

* Betrouwbaarheidsinterval berekend door bootstrap.

Vergelijking met FISH-methode voor ROS1- en ALK-fusies

25 NSCLC-monsters werden getest met FISH op zowel ROS1- als ALK-fusies en 5 aanvullende NSCLC-monsters werden getest voor ROS1-fusies. Bij acht monsters mislukte FISH voor ROS1 als gevolg van inadequaat weefsel. Er werden twee ROS1-fusies en één ALK-fusie ontdekt door zowel TSO Comprehensive (EU) en FISH. Er werden geen discordante resultaten waargenomen. [Tabel 81](#) is een samenvatting van de concordantieresultaten van TSO Comprehensive (EU) en de FISH-methode voor ROS1- en ALK-fusies.

Tabel 81 Samenvatting van de concordantieresultaten van TSO Comprehensive (EU) en de FISH-methode voor ROS1- en ALK-fusies

ALK+ROS1	FISH -positief	FISH -negatief
TSO Comprehensive (EU) Positief	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negatief	0	44
Totaal	3	44
Percentage overeenkomst	PPA: 100% (3/3) 95% BI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% BI: [92%, 100%]

Monstervaliditeit

Monstervaliditeit (eerste poging) werd gemeten voor 181 unieke RNA- en 272 unieke DNA-monsters uit FFPE-blokken met een leeftijd \leq 5 jaar. Deze monsters werden geselecteerd op basis van weefseltype en beschikbaar materiaal; validiteit van de assay was onbekend. De kwaliteitscontrolemetriek van de bibliotheek moet voldoen om het varianttype als geldig te beschouwen. De monstervaliditeit werd apart geëvalueerd voor elk van de typen varianten (kleine DNA-varianten/TMB, MSI, genamplificaties, fusies/splicevarianten) en wordt getoond in [Tabel 82](#). Voor FFPE-blokken van \leq 2 jaar oud wordt een extra afname van 1% in MSI-validiteit voorspeld als gevolg van reagensverzending.

Tabel 82 Monstervaliditeit

Varianttype	Monstervaliditeit
Fusies/splice varianten (RNA)	76%
Kleine DNA-varianten/TMB	75%
MSI	72%
Gen amplificatie	94%

Samenvatting van de analytische validatie voor tumorprofielingsclaims

Gebaseerd op gegevens voor de detectielimiet, precisie, reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid is TSO Comprehensive (EU) analytisch gevalideerd voor het volgende:

- Kleine DNA-varianten – SNV's, MNV's, inserties en deleties.
- TMB
- MSI
- MET- en ERBB2 (HER2-) genamplificaties (raadpleeg [Tabel 2](#)).
- 23 genen waarvoor fusies kunnen worden gedetecteerd (raadpleeg [Tabel 2](#)).
- EGFR- en MET-splicevarianten (raadpleeg [Tabel 2](#)).

Klinische prestaties voor NTRK

Om het TSO Comprehensive (EU)-assay te valideren als begeleidende diagnostiek (CDx) voor de selectie van patiënten voor behandeling met VITRAKVI (larotrectinib), zijn er monsters van patiënten die deelnamen aan de klinische onderzoeken met larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; gezamenlijk aangeduid als de monsters van het larotrectinib-onderzoek) met een datumgrens van 15 JULI 2019, aangevuld met commercieel verkregen FFPE-weefselmonsters, getest ter ondersteuning van een nauwkeurigheidsonderzoek voor een TSO Comprehensive (EU)-assay en een klinisch overbruggingsonderzoek.

NCT02122913 was een open-label, fase 1, dosisescalatieonderzoek in meerdere centra bij volwassen patiënten met gevorderde solide tumoren (voor alle aanmeldingen) die niet waren geselecteerd voor NTRK-fusie-positieve kanker. Na het dosisescalatiegedeelte van het onderzoek werd een dosisverhoging gestart voor patiënten met gedocumenteerde kanker positief voor NTRK-fusie en voor patiënten van wie de onderzoeker dacht dat ze baat zouden kunnen hebben bij een zeer selectieve TRK-remmer. NAVIGATE NCT02576431 is een lopend, open-label, fase 2, basket-onderzoek in meerdere centra bij patiënten van 12 jaar en ouder met terugkerende, gevorderde, solide tumoren met een gedocumenteerde NTRK-fusie, zoals beoordeeld door een extern laboratorium. SCOUT NCT02637687 is een lopend, multicenter, open-label, fase 1/2-onderzoek bij pediatrische patiënten van de geboorte tot 21 jaar met gevorderde solide of primaire tumoren van het centrale zenuwstelsel (CNS).

Van de patiënten die positief zijn voor NTRK-fusie en die opgenomen zijn in het onderzoek naar het TSO Comprehensive (EU)-assay, vormden er 164 de uitgebreide primaire werkzaamheidsset voor larotrectinib (ePAS4).

Nauwkeurigheidsonderzoek voor detectie van NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusie

De nauwkeurigheid van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor het detecteren van NTRK-fusies (NTRK1, NTRK2 of NTRK3) bij patiënten met solide tumoren werd aangetoond door de beoordeling van de concordantie van de resultaten van de NTRK-fusie tussen het TSO Comprehensive (EU)-assay en een gevalideerde orthogonale methode op basis van NGS.

Er werd een retrospectief, niet-interventioneel onderzoek uitgevoerd. Er werden larotrectinib-onderzoeksmonsters en aanvullende monsters getest met het TSO Comprehensive (EU)-assay op één externe locatie en met een orthogonale methode in een centraal laboratorium. De nauwkeurigheid van NTRK-fusiebepalingen met het TSO Comprehensive (EU)-assay werd geschat ten opzichte van de orthogonale methode; positieve procentuele overeenstemming (PPA), negatieve procentuele overeenstemming (NPA) en de bijbehorende tweezijdige betrouwbaarheidsintervallen (BI's) van 95% werden berekend.

Er werden 516 monsters getest met het TSO Comprehensive (EU)-assay en/of de orthogonale methode. Hiervan werden er 499 getest met beide methoden. Zeventien van de 516 monsters werden niet getest met een van de assays vanwege een mislukte extractie, onbekende reden (voor de orthogonale methode) of protocolafwijking. Van de 499 monsters die met beide methoden werden getest, waren 170 (34,1%) larotrectinib-onderzoeksmonsters en 329 (65,9%) waren aanvullende monsters.

Een kruistabel van resultaten voor de 499 monsters wordt weergegeven in [Tabel 83](#). Van de 499 monsters hadden 85 monsters ongeldige resultaten met het TSO Comprehensive (EU)-assay; van deze 85 hadden er 53 ook ongeldige resultaten met de orthogonale methode. Zeven extra monsters hadden ongeldige resultaten voor de orthogonale methode. Daarom hadden 407 van de 499 monsters volgens beide methoden geldige resultaten.

Tabel 83 Onderzoek naar de nauwkeurigheid voor NTRK: Kruistabel van resultaten van de TSO Comprehensive (EU) versus resultaten van de orthogonale methode voor het detecteren van NTRK-fusies

Resultaat van het TSO Comprehensive (EU)-assay	Resultaten orthogonale methode			
	NTRK -fusie-positief	NTRK -fusie-negatief	Ongeldig	Totaal
NTRK-fusie-positief	114	16	1	131
NTRK-fusie-negatief	4	273	6	283
Ongeldig*	4	28	53	85
Totaal	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) ongeldige resultaten van het -assay komen van de monster- en runniveaus.

De overeenkomstanalyses, met uitzondering van en met inbegrip van ongeldige resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay worden weergegeven in [Tabel 84](#). Met uitzondering van ongeldige resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay was de PPA 96,6% (114/118; 95% BI: 91,5% – 99,1%) en de NPA 94,5% (273/289; 95% BI: 91,2% – 96,8%).

Tabel 84 Onderzoek naar de nauwkeurigheid voor NTRK: De PPA en NPA van het TSO Comprehensive (EU)-assay in vergelijking met de resultaten van de orthogonale methode voor het detecteren van NTRK-fusies

Meting overeenkomst	Met uitzondering van ongeldige resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay		Met inbegrip van ongeldige resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay	
	Overeenkomst, % (n/N)	95% BI*	Overeenkomst, % (n/N)	95% BI*
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% BI op basis van de (exacte) Clopper-Pearson-methode.

Klinisch overbruggingsonderzoek voor detectie NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusie

De klinische validiteit van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor het detecteren van NTRK1-, NTRK2- of NTRK3-fusies bij patiënten met solide tumoren die baat kunnen hebben bij een behandeling met larotrectinib, werd aangetoond in een klinisch overbruggingsonderzoek. Het onderzoek werd uitgevoerd om de klinische effectiviteit te beoordelen van het TSO Comprehensive (EU)-assay om patiënten met een positieve reactie op NTRK1-, NTRK2- of NTRK3-fusie te identificeren voor behandeling met larotrectinib, en voor het beoordelen van de concordantie tussen het TSO Comprehensive (EU)-assay en lokale testmethoden (LT), (die worden gebruikt om de status van de NTRK-fusie te bepalen voor de klinische onderzoeken met larotrectinib).

LT-methoden omvatten NGS, fluorescerende in situ hybridisatie (FISH), polymerasekettingreactie (PCR) en Nanostring-assays. NTRK-fusies (ETV6 NTRK3) werden afgeleid voor patiënten met infantiel fibrosaroom die een gedocumenteerde, door FISH geïdentificeerde ETV6-translocatie hadden. De meerderheid van de 235 patiënten in het larotrectinib-onderzoek met een bekende NTRK-fusiestatus is getest met NGS-methoden.

Op de einddatum van de gegevens 15 JUL 2019 namen 279 patiënten deel. Van de 279 patiënten toonden 208 een positieve NTRK-fusie. Van de 208 positieve patiënten vormden 164 de larotrectinib ePAS4.

Het primaire eindpunt voor de larotrectinib-analyse van de werkzaamheid was het totale responspercentage (ORR, overall response rate) volgens de beoordeling van de onafhankelijke beoordelingscommissie (IRC, independent review committee) in een gepoolde gegevensset van de drie klinische onderzoeken. De ORR werd beoordeeld op basis van het percentage patiënten met de beste algehele respons van bevestigde volledige respons of bevestigde gedeeltelijke respons op basis van de RECIST-criteria, versie 1.1. De ORR in de larotrectinib ePAS4 was 72,6% (95% BI [65,1%, 79,2%]) en omvatte patiënten met 16 verschillende tumortypes.

Monsterberekening

De monsterset omvatte een representatie van een breed scala aan tumortypes en monsters van pediatrische en volwassen patiënten.

Op 15 JUL 2019 waren er 279 patiënten ingeschreven in de larotrectinib-onderzoeken. Hiervan hadden 235 patiënten een bekende NTRK-fusiestatus zoals bepaald met een LT-methode: 208 waren positief en 27 waren negatief. Voor 44 patiënten was de NTRK-fusiestatus onbekend, aangezien testen niet vereist was voor de patiënt om in aanmerking te komen voor de dosisescalatiefasen van de onderzoeken NCT02122913 en SCOUT NCT02637687. Bij het klinische overbruggingsonderzoek van het TSO Comprehensive (EU)-assay kwamen monsters van larotrectinib-onderzoekspatiënten met een bekende NTRK-fusiestatus (208 positieve patiënten en 27 negatieve patiënten) die ingeschreven waren op 15 JUL 2019 en de aanvullende monsters die negatief waren bevonden voor NTRK-fusie volgens representatieve LT-methoden in aanmerking voor dit onderzoek.

Van de 208 positieve larotrectinib-onderzoeksmoesters hadden 154 een monster dat beschikbaar was voor het testen met het TSO Comprehensive (EU)-assay. Hiervan toonden 138 geldige resultaten. Vijftien monsters waren ongeldig vanwege mislukte kwaliteitsstatistieken van de monstersequencing en 1 monster werd niet getest vanwege een afwijking van het protocol. Van de 27 negatieve larotrectinib-onderzoeksmoesters hadden 24 een monster beschikbaar voor het testen. Hiervan hadden er 22 geldige resultaten bij het TSO Comprehensive (EU)-assay. Twee monsters waren ongeldig vanwege mislukte kwaliteitsstatistieken van de monstersequencing.

Aanvullende monsters werden gescreend met behulp van een van de twee representatieve LT-methoden. Er werden meer dan 350 monsters verkregen en onderzocht op tumorinhoud. Van de aanvullende monsters die aan de vereisten voor monsters voldeden, werden er 266 met succes geëxtraheerd en bevestigd als NTRK-fusie-negatief met behulp van een representatieve LT-methode. Van deze monsters waren er 260 beschikbaar voor testen met het TSO Comprehensive (EU)-assay, waarvan er 222 geldige resultaten hadden. 38 monsters waren ongeldig vanwege mislukte metingen van de monstersequencing (n = 25) of mislukte sequencing van de run (n = 13). De totale set die negatief was voor NTRK-fusie bestond uit 222 aanvullende monsters en 22 larotrectinib-onderzoeksmoesters.

Resultaten concordantie

In totaal werden er 437 monsters getest door TSO Comprehensive (EU). Van de 208 patiënten die een positieve NTRK-fusie toonden, waren er 153 die beschikbare monsters hadden en werden getest door TSO Comprehensive (EU), wat 138 geldige resultaten en 15 ongeldige resultaten opleverde.

Overeenkomst van TSO Comprehensive (EU)-resultaten ten opzichte van resultaten van LT-methoden, met en zonder ongeldige TSO Comprehensive (EU)-resultaten, worden weergegeven in [Tabel 85](#).

Tabel 85 NTRK klinisch overbruggingsonderzoek: Concordantie tussen het TSO Comprehensive (EU)-assay en LT-methoden voor detectie van NTRK-fusies

Meting overeenkomst	Met uitzondering van ongeldige resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay		Met inbegrip van ongeldige resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay	
	% Overeenkomst (n/N)	95% BI*	% Overeenkomst (n/N)	95% BI*
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

* Het tweezijdige 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) werd berekend met behulp van de (exacte) Clopper-Pearson-methode.

Gevoeligheidsanalyse tegen de ontbrekende resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay toonde de robuustheid van de overeenkomstanalyse aan. Ontbrekende resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay voor de patiënten die positief zijn voor NTRK-fusie volgens LT (n = 70) werden met behulp van een logistisch regressiemodel geïmputeerd. Geschatte overeenkomst, inclusief de geïmputeerde waarden, worden in [Tabel 86](#) weergegeven.

Tabel 86 NTRK klinisch overbruggingsonderzoek: Concordantie tussen het TSO Comprehensive (EU)-assay en LT-methoden voor de detectie van NTRK-fusies inclusief geïmputeerde waarden voor LT-positieve patiënten met ontbrekende resultaten voor het TSO Comprehensive (EU)-assay

Meting overeenkomst	% overeenkomst	95% BI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Ontbrekende TSO Comprehensive (EU) assayresultaten voor fusie-negatieve patiënten volgens LT werden niet geïmputeerd.

* De tweezijdige 95% betrouwbaarheidsintervallen (BI's) worden berekend op basis van de Boot-methode voor meervoudige imputatie. De Boot-methode voor meervoudige imputatie is een bootstrap-stap die gebaseerd is op de meervoudige imputatie (Schomaker en Heumann 2018).

Overeenkomsten tussen het TSO Comprehensive (EU)-assay en LT's per methodetype (zoals RNA NGS, FISH) worden weergegeven in [Tabel 87](#).

Tabel 87 NTRK klinisch overbruggingsonderzoek: Concordantie tussen het TSO Comprehensive (EU)-assay en LT-methoden voor de detectie van NTRK-fusies per type LT-methode

LT-methodetype	Mate van overeenkomst	% Overeenkomst (n/N)	95% BI 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	Niet berekend (1/1)	Niet berekend
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Niet berekend (0/0)	Niet berekend
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Niet berekend: voor subgroepen met monsteraantal < 5 werden geen overeenkomststatistieken berekend.

¹ Het tweezijdige 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) werd berekend met behulp van de (exacte) Clopper-Pearson-methode.

² Inclusief NGS-methodes waarbij uitsluitend RNA en zowel DNA als RNA wordt gebruikt.

Van de 437 monsters die werden getest met het TSO Comprehensive (EU)-assay, hadden er 24 discordante resultaten met de LT's: 15 waren positief volgens de LT's en negatief volgens het TSO Comprehensive (EU)-assay en 9 waren negatief volgens de LT's en positief volgens het TSO Comprehensive (EU)-assay. Van de 24 monsters met discordante resultaten werden er 8 getest met een DNA NGS LT-methode, 14 met een RNA NGS LT-methode en 2 met FISH.

Een gevalideerde onafhankelijke NGS-methode bevestigde de resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay in 14 van de 24 monsters met discordante resultaten. Bij de overige 10 monsters waren de resultaten van het TSO Comprehensive (EU)-assay discordant met zowel de LT- als de onafhankelijke NGS-methode.

Resultaten klinische werkzaamheid

In het ePAS4-cohort was de werkzaamheid van larotrectinib in de TSO Comprehensive (EU)-positieve, LT-positieve populatie (97 patiënten, ORR=78,4%, 95% BI [68,8%, 86,1%]) vergelijkbaar met de werkzaamheid van larotrectinib in de totale ePAS4-populatie (164 patiënten, ORR=72,6%, 95% BI [65,1%, 79,2%]) (Tabel 88). Van de 97 TSO Comprehensive (EU)-positieve patiënten in de ePAS4 hadden 28 (28,9%) patiënten een volledige respons/chirurgisch volledige respons bereikt en 48 (49,5%) patiënten bereikten een gedeeltelijke respons.

Van de 13 TSO Comprehensive (EU)-negatieve, LT-positieve populatie, vertoonde er 1 (7,7%) een volledige respons en 2 (15,4%) vertoonden een gedeeltelijke respons bij behandeling met larotrectinib.

Tabel 88 NTRK klinisch overbruggingsonderzoek: ORR voor LT-positieve patiënten volgens LT en TSO Comprehensive (EU)-resultaten in ePAS4

		LT-fusie -positief N=164	TSO Comprehensive (EU) Positief en LT-positief N=97	TSO Comprehensive (EU) Negatief en LT- positief N=13
Beste algehele respons, n (%)	Volledige respons	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Chirurgisch volledige respons	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Gedeeltelijke respons	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabiel ziektebeeld	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progressief ziektebeeld	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Niet te beoordelen	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Algehele respons	Aantal patiënten, n	164	97	13
	Aantal patiënten met CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95% BI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Afkortingen: CR (Complete Response) = Volledige respons, PR (Partial Response) = Gedeeltelijke respons, sCR (Surgical Complete Response) = Chirurgisch volledige respons.

* Het tweezijdige 95% betrouwbaarheidsinterval werd berekend met behulp van de (exacte) Clopper-Pearson-methode. Bij 54 patiënten ontbreken de TSO Comprehensive (EU) assayresultaten.

De gegevens van dit onderzoek ondersteunen de veiligheid en effectiviteit van het TSO Comprehensive (EU)-assay wanneer deze worden gebruikt om patiënten met solide tumoren met NTRK-fusies te identificeren die mogelijk in aanmerking komen voor behandeling met larotrectinib.

Referenties

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

Revisiegeschiedenis

Revisie	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200007789 v08	mei 2025	<p>Verwijzing naar softwareversies en onderdeelnummers verwijderd.</p> <p>Bijgewerkte beperkingen van de procedure:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Informatie over necrotisch weefsel. • Informatie over MSI-tumorinhoud. <p>Bijgewerkt:</p> <ul style="list-style-type: none"> • NTC-voetnoot voor zowel minimale als maximale bibliotheekhoeveelheden. • Specificaties van apparatuur en materialen: plaatcentrifuge en pipetstappen. • SPB-berekening met overschot aangepast van 1,05x naar 1,15x. • Terminologie: van MET exon 14-deletie naar MET exon 14-skipping. <p>Toegevoegd:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opmerking voor SMB in Vastleggen doelen - één en twee. • Voorbereiding op de introductie van de sequentie. • Aanvullende ultrasonicator informatie. <p>Toegevoegde verduidelijkingen en bijgewerkte resultaten voor prestatiekenmerken:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Storende stoffen. • Nauwkeurigheid bij tumorprofilering en validiteit van monsters. • Detectielimiet onderzoek 1 en 2. • Intralaboratoriumprecisie onderzoek 1. • Reproduceerbaarheid onderzoek 2. • Informatie over bibliotheekstabiliteit en bibliotheekopslag. • Blancolimiet. <p>Taal en grammatica bijgewerkt.</p>

Revisie	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200007789 v07	januari 2024	<ul style="list-style-type: none"> • Informatie toegevoegd aan 'Beperkingen van de procedure': <ul style="list-style-type: none"> • Vereisten voor monsters met necrotisch weefsel en tumorinhoud voor MSI-hoge en somatische drivermutaties. • Mogelijke interferentie door hemoglobine. • Detectielimieten in het RET-gen en fusiebepalingen buiten de geannoteerde gengrenzen. • Gendeleties worden niet gerapporteerd. • Bijgewerkt voor gebruik met TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager softwareversie 2.3.7. • Informatie toegevoegd aan de vereiste maar niet geleverde apparatuur en materialen, inclusief twee extra ultrasonicatorconfiguraties. • Bijgewerkte monster- en specimeninformatie: <ul style="list-style-type: none"> • Necrotisch weefselgehalte. • Effecten van proteïnase K en hemoglobine. • Opslag van FFPE op een objectglasje en gezuiverd nucleïnezuur. • Informatie toegevoegd om de reagensverwerking, de workflow en het oplossen van QC-fouten te verbeteren. • Context en duidelijkheid toegevoegd aan prestatiekenmerken: <ul style="list-style-type: none"> • Kruisbesmetting • Evaluatie van extractiekits voor nucleïnezuur • Storende stoffen • Nucleïnezuur en stabiliteit van FFPE op objectglasjes • Klinische prestaties voor NTRK • Taal en grammatica bijgewerkt
Documentnr. 200007789 v06	februari 2023	<ul style="list-style-type: none"> • Aanvullende verklaringen in de paragraaf Beperkingen • Taalupdates voor conventie, grammatica en duidelijkheid • Correctie van de tabellen 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Verklaring over de aanwezigheid van precipitaten in FSM-reagens • Bijgewerkte specificaties van de thermocycler en bak in de lijst Apparatuur en materialen
Documentnr. 200007789 v05	september 2022	Reproduceerbaarheidstabellen uit onderzoek 2 bijgewerkt
Documentnr. 200007789 v04	juni 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Onderdeelnummers voor TSO Comprehensive-analysemodule v2.3.5 toegevoegd • Onderdeelnummers voor TSO Comprehensive-analysemodule v2.3.3 verwijderd • Terminologie in de paragraaf Blancolimiet bijgewerkt

Revisie	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200007789 v03	april 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Informatie toegevoegd over prestatiekenmerken met betrekking tot NTRK-fusies • De markering UITSLUITEND VOOR EXPORT toegevoegd • Beoogde gebruiksverklaring bijgewerkt om de NTRK1-3 CDx-claim toe te voegen • Informatie over productonderdelen uitgebreid met onderdeelnummers van softwareonderdelen
Documentnr. 200007789 v02	februari 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Fout in tabelverwijzing gecorrigeerd • Een beperking met betrekking tot kiemlijn- en somatische varianten toegevoegd • De tekst rond detectie van genamplificatie verduidelijkt
Documentnr. 200007789 v01	december 2021	<ul style="list-style-type: none"> • Beperkingen van de procedure bijgewerkt • De specificaties van de magnetische standaard en thermocycler zijn verduidelijkt in de lijst Apparatuur en materialen
Documentnr. 200007789 v00	november 2021	Eerste release

Octrooien en handelsmerken

Dit document en de inhoud ervan zijn eigendom van Illumina, Inc. en haar dochterondernemingen ('Illumina') en zijn alleen bedoeld voor contractueel gebruik door haar klanten in verband met het gebruik van het/de hierin beschreven product(en) en voor geen enkel ander doel. Dit document en de inhoud ervan mogen niet zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van Illumina worden gebruikt of gedistribueerd voor welk ander doel dan ook en/of op een andere manier worden gecommuniceerd, geopenbaard of gereproduceerd. Illumina verleent met dit document geen licenties onder zijn octrooi-, handelsmerk-, auteursrecht of gewoonterechten noch soortgelijke rechten van derden.

De instructies in dit document moeten strikt en uitdrukkelijk worden opgevolgd door gekwalificeerd en voldoende opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van het/de hierin beschreven product(en) te waarborgen. Alle inhoud van dit document moet volledig worden gelezen en begrepen voordat dergelijk(e) product(en) worden gebruikt.

HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN (INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN) EN SCHADE AAN ANDERE EIGENDOMMEN. BIJ HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT VERVALLEN ALLE GARANTIES DIE VAN TOEPASSING ZIJN OP HET/DE PRODUCT(EN).

ILLUMINA IS OP GEEN ENKELE MANIER AANSPRAKELIJK VOOR GEVOLGEN VAN EEN ONJUIST GEBRUIK VAN DE PRODUCTEN DIE HIERIN WORDEN BESCHREVEN (INCLUSIEF DELEN DAARVAN OF SOFTWARE).

© 2025 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn het eigendom van Illumina, Inc. of van hun respectievelijke eigenaren. Ga naar www.illumina.com/company/legal.html voor informatie over specifieke handelsmerken.

Contactgegevens



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Californië 92122 VS
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (buiten Noord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



EC REP



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

Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die op de verpakkingen en labels van de producten staan, de symbolenlijst voor uw kit op support.illumina.com op het tabblad *Documentation* (Documentatie).