

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Pakningsvedlegg

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK. KUN FOR EKSPORT.

Tiltenkt bruk

TruSight™ Oncology Comprehensive(EU) er en *in vitro*-diagnostisk test som bruker målrettet nestegenerasjons sekvensering til å påvise varianter i 517 gener ved hjelp av nukleinsyrer ekstrahert fra formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) tumorvevsprøver fra kreftpasienter med solide ondartede tumorer ved hjelp av Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrumentet. Testen kan brukes til å detektere enkeltnukleotidvarianter, multinukleotidvarianter, insersjoner, delesjoner og genforsterkninger fra DNA, og genfusjoner og spleisevarianter fra RNA. Testen rapporterer også et resultat for tumormutasjonsbyrde (TMB) og en status for mikrosatellittustabilitet (MSI).

Testen er ment som en CDx for å identifisere kreftpasienter for behandling med den målrettede behandlingen vist [Tabell 1](#) i samsvar med den godkjente terapeutiske produktmerkingen. I tillegg er testen ment å gi informasjon om tumorprofilering som skal brukes av kvalifisert helsepersonell i samsvar med faglige retningslinjer, og er ikke konklusiv eller preskriptiv for merket bruk av spesifikke terapeutiske produkter.

Tabell 1 Indikasjon for CDx

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

Oppsummering og forklaring av analysen

Klinisk beskrivelse

Kreft er en ledende dødsårsak over hele verden og kan potensielt oppstå i enhver type vev.^{1, 2} Analyse av en krefts genetiske grunnlag er viktig for å identifisere pasienter som kan dra nytte av målrettede terapier, og for å utvikle nye behandlingsmetoder. En rekke gener er implisert i kreftdannelse eller -progresjon, og mange typer kreft bærer en rekke varianter som påvirker disse genene og deres funksjoner. Disse variantene kan omfatte genmutasjoner som enkeltnukleotidvarianter (SNV-er), multinukleotidvarianter (MNV-er), insersjoner eller delesjoner, genforsterkninger, genfusjoner og spleisevarianter. En annen konsekvens av kreftgenmutasjoner er presentasjon av neoantigener som frembringer kreftspesifikke immunreaksjoner. En krefts mutasjonsstatus kan representeres ved TMB og MSI, som er genomiske signaturer som er assosiert med genomisk ustabilitet og forekomst av kreftneoantigen.

TruSight Oncology Comprehensive er en kvalitativ test for neste generasjons sekvensering (NGS) med omfattende genomprofilering (CGP) som gir en bred vurdering av genomiske varianter i et stort panel med kreftrelaterte gener oppført i [Tabell 2](#). Analysen detekterer små varianter i 517 gener pluss genforsterkninger, fusjoner og spleisevarianter som angitt i [Tabell 2](#). Analysen gir kodesekvensdekning for alle gener unntatt TERT, der bare aktivatorregionen er dekket og vurderer TMB-score og MSI-status. Disse analysemålene inkluderer innhold sitert av profesjonelle organisasjoner og andre store amerikanske retningslinjer. Uavhengige konsortiepublikasjoner og farmasøytisk forskning på sen stadium påvirket også utformingen av TSO Comprehensive-analysen.

En liste over regionene som er utelatt fra variantbetegnelse, finnes i *TruSight Oncology Comprehensive Blokkeringsliste (dokumentnr. 200009524)*, som er tilgjengelig fra Illumina [-støttenettstedet](#).

I [Tabell 2](#) identifiseres fire varianttypekategorier: Små-DNA-variant (S), genamplifisering (A), fusjon (F), spleisevariant (Sp). Små DNA-varianter omfatter SNV-er, MNV-er samt insersjoner og delesjoner.

Tabell 2 TSO Comprehensive (EU) Analysegenpanel

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
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S

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

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

Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
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

Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	N/A	N/A	N/A	N/A
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N/A	N/A	N/A	N/A
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N/A	N/A	N/A	N/A
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N/A	N/A	N/A	N/A
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N/A	N/A	N/A	N/A
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N/A	N/A	N/A	N/A
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N/A	N/A	N/A	N/A
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N/A	N/A	N/A	N/A

Prosedyreprinsipper

TSO Comprehensive (EU)-analysen er en distribuert test som utføres manuelt ved hjelp av ekstrahert nukleinsyre som inngangsmateriale. DNA og/eller RNA ekstrahert fra formalinfiksert parafinintegret (FFPE)-vev brukes til å klargjøre biblioteker som deretter anrikes for kreft-relaterte gener og sekvenseres på NextSeq 550Dx-instrumentet.

TSO Comprehensive (EU)-analysen involverer følgende prosesser.

- **Bibliotekklargjøring og -anriking** – 40 ng samlet RNA konverteres til dobbeltrådet komplementært DNA (cDNA). 40 ng genomisk DNA (gDNA) kuttes i små fragmenter. Universelle adaptere for sekvensering liggeres på cDNA- og gDNA-fragmentene. Adaptersekvensene P5 og P7 er integrert i hvert bibliotek for å gjøre det mulig å fange bibliotekfragmenter på overflaten av strømningssellen under sekvensering. Adapterne inkluderer i5- og i7-indekssekvenser for å identifisere hver enkelt prøve, og når det gjelder biblioteker fra gDNA-prøver, individuelle molekyler ved hjelp av unike molekylidentifikatorer (UMI-er). Bibliotekene anrikes deretter for de spesifikke genene av interesse ved hjelp av en fangstbasert metode. Biotinylerte probesekvenser som dekker genregioner av interesse og målrettet for analysen hybridiseres til bibliotekene. Probene og de hybridiserte målrettede bibliotekene isoleres fra ikke-målrettede biblioteker ved fangst med streptavidinbelagte magnetiske partikler. De målrettede anrikede bibliotekene vaskes og amplifiseres. Mengden av hvert anriket bibliotek blir deretter normalisert ved hjelp av en kulebasert metode for å sikre lik representasjon av de sammenslåtte bibliotekene for sekvensering.
- **Sekvensering og primæranalyse** – Normaliserte, anrikede biblioteker slås sammen og klynges på en strømningsselle, og sekvenseres deretter ved hjelp av sekvensering ved syntese (SBS)-kjemi på NextSeq 550Dx. SBS-kjemi bruker en reversibel terminator-metode for å påvise enkle, fluorescensmerkede deoksynukleotidtrifosfat (dNTP)-baser idet de blir inkorporert i voksende DNA-tråder. Under hver sekvenseringscyklus tilsettes et enkelt dNTP i nukleinsyrekjeden. dNTP-etiketten fungerer som en terminator for polymerisering. Det fluorescerende fargestoffet avbildes etter hver dNTP-inkorporering for å identifisere basen og spaltes deretter for å muliggjøre inkorporering av det neste nukleotidet. Fire reversibel terminator-bundne dNTP-er (A, G, T og C) foreligger som separate enkeltmolekyler. Naturlig konkurranse begrenser derfor inkorporeringsavvik. Under primæranalysen foretas basebestemmelser direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekvenseringscyklus. Dette fører til base-for-base-sekvensering. En kvalitetsscore tilordnes hvert baseanrop.
- **Sekundæranalyse** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module ligger på NextSeq 550Dx-instrumentet som en del av Local Run Manager-programvaren for å legge til rette for TSO Comprehensive (EU)-kjøringsoppsettet og for å utføre sekundæranalyse av sekvenseringsresultater. Sekundæranalysen omfatter validering av kjøringsbehandling og kvalitetskontroll, etterfulgt av demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting og variantbetegnelse. Demultipleksing separerer data fra poolede biblioteker basert på de unike sekvensindeksene som ble lagt til under prosedyren for bibliotekklargjøring. Det genereres FASTQ-mellomfiler som inneholder sekvenseringsavlesningene for hver prøve og kvalitetsresultatene, unntatt avlesninger fra klynger som ikke passerte filtreringen. Sekvenseringsavlesningene innrettes deretter mot et referansegenom for å identifisere en relasjon mellom sekvensene, og blir tilordnet et resultat basert på lignende regioner. Sammenstilte avlesninger skrives til filer i BAM-format. Analyseprogramvaren bruker separate algoritmer for biblioteker generert fra DNA- og/eller RNA-prøver for å betegne små DNA-varianter, genforsterkninger, TMB og MSI for DNA-prøver og fusjoner og spleisevarianter for RNA-prøver. Flere utdata genereres av analyseprogramvaremodulen, herunder sekvenseringsmetrikk og Variant Call Format (VCF)-filer. VCF-filene inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom. Sekvenseringsmetrikk og individuelle

utdatafiler genereres for hver prøve. Se *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)* for detaljer om sekundær og tertiær analyse.

- **Tertiæranalyse** – Tertiæranalyse utført av Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module, består av TMB- og MSI-beregninger, betegnelse av CDx, tumorprofilering av varianter i to nivåer av klinisk signifikans ved hjelp av en kunnskapsbase (KB) og vevstypen og resultatrapportgenerering. Tumorprofilering kan også kalles omfattende genomprofilering. De tolkede variantresultatene og TMB- og MSI-biomarkørresultatene, er oppsummert i rapporten med TSO Comprehensive (EU)-resultater.

Prosedyremessige begrensninger

Kun til *in vitro*-diagnostisk bruk.

- Kun for bruk på resept. Testen skal brukes i henhold til forskrifter for kliniske laboratorier.
- Genomfunn som er oppgitt i [Tabell 2](#) under tiltenkt bruk, er ikke preskriptive eller konklusive for merket bruk av spesifikke terapeutiske produkter.
- Klinisk validering er ikke utført for varianter som er oppgitt i TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten under Genomfunn med dokumentert klinisk signifikans (nivå 2) og Genomfunn med potensiell klinisk signifikans (nivå 3).
- Beslutninger om pasientomsorg og -behandling må baseres på den behandlende legens uavhengige medisinske vurdering, og der det er tatt hensyn til all relevant informasjon om pasientens tilstand, f.eks. pasient- og familieanamnese, fysiske undersøkelser, informasjon fra andre diagnostiske tester og pasientens preferanser, i henhold til standardbehandling i et gitt samfunn.
- FFPE-prøvekvalitet er svært varierende. Prøver som ikke gjennomgikk standard fikseringsprosedyrer, genererer kanskje ikke ekstraherte nukleinsyrer som oppfyller kvalitetskontrollkravene for analysen ([Kvalitetskontroll på side 78](#)). FFPE-blokker som har blitt oppbevart lenger enn fem år, har vist lavere gyldighet.
- Ytelsen til TSO Comprehensive (EU) i prøver tatt fra pasienter som har mottatt organ- eller vevstransplantasjon, er ikke evaluert.
- Store mengder nekrotisk vev ($\geq 23\%$) kan forstyrre TSO Comprehensive (EU)-analysens evne til å detektere genforsterkninger og RNA-fusjoner.
- Somatiske drivermutasjoner kan ikke påvises pålitelig hvis tumorinnholdet (etter område) er mindre enn 20 %.
- Et utfall av mikrosatellittstabil (MS-Stable) kan være upålitelig hvis tumorinnholdet er mindre enn 30 %. Et utfall av mikrosatellitt høy (MSI-høy) er riktig uavhengig av tumorinnhold.
- Hemoglobin assosiert med vev reduserer støtteavlesninger for MET-spleisevarianter.
- I svært omstrukturerte genomer med delesjoner og tap av heterozygositet, kan TSO Comprehensive (EU)-programvare feilaktig klassifisere en DNA-prøve som kontaminert (CONTAMINATION_SCORE > 3106 og p-verdi > 0,049).

- Et negativt resultat utelukker ikke tilstedeværelse av en mutasjon under deteksjonsgrensene (LoD) for analysen.
- Sensitiviteten for deteksjon av små DNA-varianter kan påvirkes av:
 - Genomisk kontekst med lav kompleksitet.
 - Økende variantlengde.
- TMB-score kan være unøyaktige i følgende kontekster:
 - Når tumorinnhold når nivåer der kimbane og somatiske variantallelfrekvenser (VAF-er) konvergerer.
 - I populasjoner som ikke er godt representert i offentlige databaser.
- Genforsterkninger er de eneste kopinummervariantene rapportert av TSO Comprehensive (EU). Genslettinger rapporteres ikke av analysen.
- Fusjonsbetegnelsesalgoritmer i TSO Comprehensive (EU)-analyseprogramvaren vil kanskje ikke vurdere bevis fra avlesninger som strekker seg utenfor annoterte gengrenser.
- Sensitiviteten for deteksjon av fusjoner kan påvirkes:
 - Ved lav bibliotekkompleksitet som fører til reduserte støtteavlesninger på grunn av avvik i analysearbeidsflyten (følg for eksempel blandetrinn i [Denaturere og renaturere RNA på side 43](#)).
 - Når et enkelt gen spenner over begge bruddpunkter.
 - I tilfeller der bruddpunkter for flere fusjoner er i umiddelbar nærhet av hverandre med én eller flere partnere kan de flere bruddpunktene og partnerne kan rapporteres som ett enkelt bruddpunkt og én partner.
 - Etter små mediane innsatsstørrelser. En minimum median innsatsstørrelse på 80 bp er påkrevd, men sensitivitet reduseres i området 80–100 bp.
 - Ved lav sekvenskompleksitet eller homolog genomisk kontekst rundt fusjonsbruddpunkter.
- Oppløsningen til genene som er involvert i en fusjon, kan påvirkes når fusjonsbruddpunkter oppstår i genomiske regioner som inneholder overlappende gener. Analysen vil rapportere alle gener, avgrenset med semikolon, hvis flere gener overlapper et bruddpunkt.
- Inkonsekvent dekning i TERT-aktivatorregionen kan resultere i ingen resultater på grunn av lav dybde.
- Annoterings- eller KB-feil kan forårsake et falskt positivt eller falskt negativt resultat, inkludert oppføring av en variant på feil nivå (mellom Genomfunn med dokumentert klinisk signifikans [nivå 2] og Genomfunn med potensiell klinisk signifikans [nivå 3]), eller annoteringsinformasjonen i rapporten kan være feil. Varianter som er rapportert i CDx-resultatene, påvirkes ikke av annoteringer eller KB-feil. Muligheten for feil eksisterer fra følgende tre kilder:
 - TSO Comprehensive (EU) variantannotering. Det er en feilrate på ca. 0,0027 % basert på en analyse av 2 448 350 varianter fra COSMIC v92, og det er derfor liten mulighet for feil.
 - KB-feil på grunn av kurasjonsprosessen.
 - Relevansen av KB-innhold endres over tid. Denne rapporten gjenspeiler kunnskapen på tidspunktet da KB-versjonen ble kuratert.

- TSO Comprehensive (EU) er utviklet for å rapportere somatiske varianter ved rapportering av varianter med evidens av klinisk signifikans eller varianter med mulig klinisk signifikans. Som test kun for tumorer er kimbanevariantrapportering (nedarvet) mulig, men utilsiktet. TSO Comprehensive (EU) bruker en KB til å rapportere varianter uten uttrykkelig å annotere om de skriver seg fra kimbane eller har somatisk opprinnelse.
- KB inkluderer kun terapeutiske, diagnostiske og prognostiske tilknytninger som er relevante for varianter som er til stede i en etablert solid ondartet tumor. Tilknytninger med kreftrisiko eller mottakelighet tas ikke med i KB.
- Følgende tabell viser nukleotidendringene for tre RET-varianter som analysen ikke kan detektere. Andre nukleotidendringer for samme aminosyreendring kan detekteres.

Tabell 3 Nukleotidendringer for tre RET-varianter

Aminosyreendring	Chr*	Posisjon	Referanseallel	Alternativ
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = Kromosom

Produktkomponenter

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

- TruSight Oncology Comprehensive (EU)-sett (Illumina katalognr. 20063092) – Settet inneholder reagenser med tilstrekkelig volum til å generere 24 DNA- og 24 RNA-biblioteker. Dette volumet inkluderer pasientprøver og kontroller. Kontroller selges separat (se [Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med på side 17](#)).
- Kunnskapsbase: Oppdatert regelmessig og tilgjengelig for nedlasting på Illumina Lighthouse Portal.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina katalognr. 20051843), som inneholder følgende komponenter:
 - TSO Comprehensive kravpakker
 - TSO Comprehensive programvarepakke

- TSO Comprehensive USB-sett

En servicerepresentant fra Illumina vil installere riktig versjon av TSO Comprehensive (EU) analysemodul på Local Run Manager NextSeq 550Dx-instrumentet. For detaljert analyseinformasjon, se Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661).

Reagenser

Reagenser som følger med

Følgende reagenser følger med TSO Comprehensive (EU)-settet.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter, DNA-polymerase, RNase H og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og tilfeldige heksamere	-25 °C til -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Bufret vandig løsning som inneholder reverse transcriptase	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (i fryser), PN 20031118

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Bufret vandig løsning som inneholder T4 DNA-polymerase og polynukleotidkinase	-25 °C til -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Bufret vandig løsning som inneholder ligase	-25 °C til -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider for universell sekvensering	-25 °C til -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider for universell sekvensering	-25 °C til -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap), PN 20031119

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig løsning som inneholder magnetkuler	2 °C til 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-løsning	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Aktive ingredienser: Bufret vandig løsning som inneholder individuelle oligonukleotidprimere med strekkoder.

**FORSIKTIG**

Bruk unike indeksprimere (UPxx) til RNA- eller DNA-prøver. Ikke kombiner indeksprimerne CPxx og UPxx i samme bibliotek.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Aktive ingredienser: Bufret vandig løsning som inneholder individuelle oligonukleotidprimere med strekkoder.

**FORSIKTIG**

Bruk kombinasjonsindeksprimere (CPxx) bare til DNA-prøver. Ikke kombiner indeksprimere CPxx og UPxx i samme bibliotek.

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

TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap), PN 20031123

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Bufret vandig løsning som inneholder formamid og salter	2 °C til 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og fastfase paramagnetiske kuler kovalent belagt med streptavidin	2 °C til 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroksidløsning	2 °C til 8 °C

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Bufret vandig løsning	2 °C til 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler	2 °C til 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptoetanol, og formamid	2 °C til 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig løsning som inneholder magnetkuler	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser), PN 20031121

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider	-25 °C til -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Bufret vandig løsning som inneholder detergent	-25 °C til -15 °C

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Bufret vandig løsning som inneholder P5- og P7-primere	-25 °C til -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2- merkaptoetanol og formamid	-25 °C til -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 eller PhiX)	20031492	1	10 µl	Bufret vandig løsning som inneholder PhiX-genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidprobepool	-25 °C til -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidprobepool	-25 °C til -15 °C

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

Preforsterkningsreagenser

- DNA and RNA extraction and purification reagents – se [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27](#) for reagenskrav.
- DNA and RNA quantification reagents – se [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27](#) for reagenskrav.
- TruSight Oncology Kontroller:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina katalognr. 20065041)
 - TruSight Oncology RNA Control (Illumina katalognr. 20065042)
- Etanol (EtOH), 100 % (alkoholinnhold 200), molekylær biologisk kvalitet
- RNase-/DNase-fritt vann

Postforsterkningsreagenser

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) (Illumina katalognr. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykluser)
- EtOH 100 % (alkoholinnhold 200), molekylær biologisk kvalitet
- RNase-/DNase-fritt vann

Reagensoppbevaring og -håndtering

Følgende reagensesker sendes nedfrost. Oppbevares ved -25 °C til -15 °C.

Eske	Delenummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp Library Prep (i fryser)	20031118	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser)	20031121	Postforsterkning
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Postforsterkning

**FORSIKTIGHET**

Ikke lagre reagensene på et frost-fritt lager eller i dørrommene i kjøleskapet.

Følgende reagensesker sendes på gelpakker for å opprettholde 0 °C til 10 °C. Lagre ved 2 °C til 8 °C.

Eske	Delenummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap)	20031119	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap)	20031123	Postforsterkning

**FORSIKTIGHET**

Reagenser som inneholder kuler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.

- Endringer i reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Reagensene må ikke brukes hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel endringer i reagensfarge eller uklarhet).
- FSM, SSM, ERA1-B og TCB1 kan ha produktrelaterte partikler. Følg de spesifikke retningslinjene for håndtering for hver reagens. Etter å ha utført FSM- og SSM-blandingstrinn, vil gjenværende hvite produktrelaterte partikler ikke påvirke ytelsen.
- TSO Comprehensive (EU)-analysens stabilitet er evaluert, og ytelsen er demonstrert i opptil fire anvendelser av settet. Reagenser er stabile når de oppbevares i henhold til de angitte oppbevaringstemperaturene frem til utløpsdatoen som er spesifisert på etiketten på esken.

Utstyr og materiell

Nødvendig utstyr og materialer som ikke følger med

Utstyr og materiell til preforsterkning

Utstyr	Leverandør
Ultrasonikator med tilhørende tilbehør Se Innstillinger for ultralydinstrumentkonfigurasjon for DNA-fragmentering på side 22.	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Termosykler med følgende spesifikasjoner <ul style="list-style-type: none"> • Oppvarmet lokk som tåler å stilles på 30 °C og 100 °C (eller slås av hvis det ikke tåler 30 °C) • Omgj et temperaturområde på 4 °C til 99 °C • ±0,25 °C temperaturnøyaktighet • Kompatibel med 96-brønners PCR-plater, 0,2 ml • Se Rampehastighet for termosykler på side 24 	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubatorer (2) med innsatser for 96-brønners MIDI-plater (2)	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Platesentrifuge med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Kompatibel med 96-brønners mikroplater • Kapasitet 280 × g (+/- 10 %) 	Generell laboratorieleverandør
Platerister med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm kretsløp • Kan ristes ved 1200 o/min og 1800 o/min 	Generell laboratorieleverandør
Forseglingsskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Utformet for utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet (ikke bunnen) • Kompatibel med 96-brønners MIDI-plate 	Generell laboratorieleverandør
Presisjonspipetter som kan levere nøyaktig volumer mellom 2 µl og 1000 µl med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,02 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 1 µl eller 2 µl Pipettene må kalibreres regelmessig og nøyaktig innenfor 5 % av angitt volum.	Generell laboratorieleverandør
Dråpetellerhjelpemiddel	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Is eller kjøleblokk	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Avtrekkbar • Egnet til PCR-plater med kant eller delvis kant • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -20°C til 100°C • DNase-/RNase-fri 	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugerør med kapasitet på 1,7 ml, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere (engangsbeholder, 50 ml) (eller tilsvarende)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
Kompatible aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)	Fisher Scientific, delenr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønners PCR-plater compatible med termosykler, 0,2 ml (polypropylen) brønner	Generell laboratorieleverandør

Utstyr og materiell til postforsterkning

Utstyr	Leverandør
NextSeq 550Dx Instrument	Illumina, katalognr. 20005715
Platesentrifuge med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Kompatibel med 96-brønners mikroplater • Kapasitet 280 × g (+/- 10 %) 	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Termosykler med følgende spesifikasjoner <ul style="list-style-type: none"> • Oppvarmet lokk (100 °C) • Omgj et temperaturområde på 4 °C til 99 °C • ±0,25 °C temperaturnøyaktighet • Kompatibel med 96-brønners PCR-plater, 0,2 ml • Se Rampehastighet for termosykler på side 24 	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator med innsats for 96-brønners MIDI-plater	Generell laboratorieleverandør
Tørrvarmeblokk som oppfyller følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • 25 °C til 99 °C temperaturområde • ±5 °C temperaturnøyaktighet • Kontroller at mikrosentrifugerørene er kompatible med varmeblokken 	Generell laboratorieleverandør
Platerister med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm kretsløp • Kan ristes ved 1200 o/min og 1800 o/min 	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Forseglingsskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Utformet for utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet (ikke bunnen) • Kompatibel med 96-brønners MIDI-plate 	Generell laboratorieleverandør
Presisjonspipetter som kan levere nøyaktig volumer mellom 2 µl og 1000 µl med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,02 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 1 µl eller 2 µl Pipettene må kalibreres regelmessig og nøyaktig innenfor 5 % av angitt volum.	Generell laboratorieleverandør
Dråpetellerhjelpemiddel	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Avtrekkbar • Egnet til PCR-plater med kant eller delvis kant • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -20°C til 100°C • DNase-/RNase-fri 	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugerør med kapasitet på 2 ml, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugerør med kapasitet på 1,7 ml, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere (engangsbeholder, 50 ml) (eller tilsvarende)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
Kompatible aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)	Fisher Scientific, delenr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønners PCR-plater compatible med termosykler, 0,2 ml (polypropylen) brønner)	Generell laboratorieleverandør
Is eller kjøleblokk	Generell laboratorieleverandør

Innstillinger for ultralydinstrumentkonfigurasjon for DNA-fragmentering

DNA-fragmentering, eller -skjæring, påvirker analyseytelsen ved å fastslå fordelingen av fragmentstørrelsen, som igjen påvirker sekvenseringsdekning. Flere fokuserte ultralydkonfigurasjoner ble evaluert og optimalisert for TSO Comprehensive (EU)-analysen ([Tabell 4](#)).

- Skjæretid ble justert for å maksimere MEDIAN_EXON_COVERAGE-metrikken som er skissert i delen [Kvalitetskontroll på side 78](#). Skjæretiden (se [Tabell 4](#)) og MEDIAN_INSERT_SIZE-resultater var forskjellig på tvers av konfigurasjoner.

- Konfigurasjonene 1–4 og 6 ble testet med glassrør med 8 strimler. Konfigurasjon 5 brukte ett enkelt glassrør. Rørvolumkapasiteter vises i [Tabell 4](#).
- Optimalisering av konfigurasjoner 3–6 (mindre vannbadvolumer) anvendte pulsering og ble skåret i rør med mindre volum.
- Konfigurasjonene 3–5 ble kuttet i rør med mindre volum. Rørvolumkapasiteter påvirker skjærepåvirkningene.
- Konfigurasjon 4 (linjetransduser, middels stort vannbadvolum, avgasset vann) krevde en lang pulsforsinkelsestid (40 sekunder) for å oppnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE som konfigurasjon 1 og 2 ved nominell input på 40 ng.
- Optimale innstillinger for konfigurasjon 3 resulterte i en litt større fragmentstørrelsesfordeling sammenlignet med de andre konfigurasjonene (MEDIAN_INSERT_SIZE var omtrent 5–10 basepar større).
- Konfigurasjon 3 og 5 brukte ikke-avgasset vann og det minste vannbadvolumet.
- Konfigurasjoner 3 og 5 trengte økt DNA-input (50 ng for konfigurasjon 3, 60 ng for konfigurasjon 5) for å oppnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE i forhold til de andre 4 konfigurasjonene, som brukte den nominelle 40 ng-input.
- Konfigurasjoner 3 og 5 har mer skade og/eller denaturering og derfor en redusert effektiv masse av brukbare dsDNA-molekyler for bibliotekklargjøring.

Sentrifuger skjæringsrørene under gjenfinningsprosessen for å sørge for at det spesifiserte volumet gjenfinnes, ettersom tap av materiale kan påvirke ytelsen negativt.

Tabell 4 Evaluerte konfigurasjoner av fokusert ultralydinstrument

Parameter	Konfigurasjon					
	1	2	3	4	5	6
Transduser	Linje	Punkt	Punkt	Linje	Punkt	Linje
Vannbadvolum	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Vann avgasset	Ja	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja
Vannkjøler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Vannbadtemperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Største insidenseffekt (Peak Incident Power – PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% nyttefaktor	30	10	30	25	20	25
Sykluser per puls	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsering (pulser på 10 sekunder)	Nei	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja
Forsinkelsestid i pulsering	N/A	N/A	10 s	40 s	10 s	10 s
Skjæretid	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Prøvebehandling	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Partistørrelse	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Prøvestørrelse i 8-strimlers glassrør	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkeltrør (50 µl)	130 µl (eller 96 microTUBE- plate)
Dithering	N/A	N/A	N/A	3 mm Y ved 20 mm/s	N/A	1,5 mm Y ved 10 mm/s
DNA-inputekvivalent (for median eksondekning)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Skjæretiden på 200 sekunder består av pulser på 10 sekunder med 20 repetisjoner.

² Skjæretiden på 320 sekunder består av pulser på 10 sekunder med 32 repetisjoner.

Rampehastighet for termosyklur

Termisk syklusrampehastighet påvirker analysens kvalitetskontrollmetrikk (brukbare MSI-steder, CNV-mål for median bin-telling, median innsatsstørrelse (RNA)) samt støtteavlesninger for spleisevarianter og fusjoner.

Optimalisering av termisk syklusrampehastighet anbefales. En testet modell ble for eksempel justert fra en standard (og maksimal) rampehastighet på 5 °C/s til 3 °C/s for å oppnå sammenlignbare resultater med andre modeller med lavere standard rampehastigheter.

Prøvetaking, transport og oppbevaring

Følg standardprosedyrer ved innsamling, transport, oppbevaring og behandling av prøver.

Prøvekrav

FFPE-vev

TSO Comprehensive (EU)-analysen krever at 40 ng RNA og/eller 40 ng DNA ekstraheres fra FFPE-vev. Bruk av både RNA og DNA muliggjør analyse av alle spesifiserte varianttyper. Vev skal fikseres ved hjelp av formalinfiksativ egnet for molekylære analyser (for eksempel 10 % nøytralbufret formalin). Vev må ikke avkalkes. Før TSO Comprehensive (EU)-analysen utføres, må vevsprøven undersøkes av en patolog for å sørge for at den er egnet for denne testen. Minst 20 % tumorinnhold (etter område) kreves for å detektere somatiske driver-mutasjoner. Pålitelig påvisning av MSI-status på tvers av en rekke prøver krever minst 30 % tumorinnhold. Hvis en prøve testes med mindre enn 30 % tumorinnhold for å bestemme utfall med andre varianttyper, kan et MS-Stable-resultat være upålitelig. Et MSI-High-resultat er riktig uavhengig av tumorinnhold.

Tumorinnhold for genforsterkninger og RNA-varianter avhenger av graden av forsterkning eller fusjonsuttrykk (se [Tumorinnhold på side 101](#)).

For en høy sannsynlighet for å ekstrahere 40 ng RNA og 40 ng DNA fra ulike faste vevstyper, er det anbefalte vevsvolumet $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Dette volumet tilsvarer et kumulativt levedyktig vevsområde på $\geq 200 \text{ mm}^2$ ved bruk av $5 \mu\text{m}$ tykke snitt, eller $\geq 100 \text{ mm}^2$ ved bruk av $10 \mu\text{m}$ tykke snitt. Det kumulative vevsområdet er summen av det levedyktige vevsområdet i alle snitt som sendes til ekstraksjon. Et kumulativt vevsområde på 200 mm^2 kan for eksempel oppnås ved å ekstrahere fire $5 \mu\text{m}$ -snitt med vevsområde på 50 mm^2 hver eller fem $10 \mu\text{m}$ -snitt med vevsområde på 20 mm^2 hver. Vevsdød kan redusere mengden nukleinsyreutbytte. For å begrense risikoen for falskt negative resultater kan vevet makrodissekteres for å oppnå et ønsket anvendelig tumorinnhold.

Store mengder nekrotisk vev ($\geq 23 \%$ av området) kan forstyrre TSO Comprehensive (EU)-analysens evne til å detektere genforsterkninger og RNA-fusjoner. Hvis prøvesnitt inneholder mer enn 23 % nekrose i totalt vevsområde, må det nekrotiske vevet makrodissekteres. Hvis laboratoriet kjører RNA med analysen, skal vev med hemoglobin unngås eller minimeres ved innhenting av snitt fra vevsblokken. Se [Forstyrrende stoffer på side 92](#).

Objektglassmontert FFPE-vev kan oppbevares i opptil 28 dager ved romtemperatur.

Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring

- Ekstraher RNA og DNA fra FFPE-vevsprøver ved hjelp av kommersielt tilgjengelige ekstraksjonssett. Forskjeller i ekstraksjonssett kan påvirke ytelsen. Se [Evaluering av ekstraksjonssett for nukleinsyre på side 91](#).
- Ikke øk proteinase K eller tilsvarende enzym under ekstraksjon fra standardkonsentrasjonen i et ekstraksjonssett. Se [Forstyrrende stoffer på side 92](#).
- Oppbevar ekstrahert stamnukleinsyre i henhold til instruksjonene fra ekstraksjonssettets produsent.
- Oppbevar ekstrahert DNA i opptil 28 dager ved -25 °C til -15 °C .
- Oppbevar ekstrahert RNA i opptil 28 dager ved -85 °C til -65 °C .
- For å unngå endringer i konsentrasjon over tid, mål DNA og RNA innen 28 dager før bibliotekklargjøring starter. Kvantifiser RNA og DNA ved hjelp av en fluorometrisk kvantifiseringsmetode som bruker nukleinsyrebindende fargestoffer. Nukleinsyrekonsentrasjonen bør være gjennomsnittet av minst tre målinger.
- Analysen krever at 40 ng av hver RNA-prøve klargjøres i RNase-/DNase-free water (ikke inkludert) med et endelig volum på 8,5 μl (4,7 ng/ μl).
- Analysen krever 40 ng av hver gDNA-prøve med en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon på 3,33 ng/ μl . Skjæring krever et endelig volum på 52 μl (0,77 ng/ μl), der minimum 40 μl TEB (inkludert) brukes som fortyner.

Biblioteklagring

Biblioteker kan lagres på PCR-plater i 7 til 32 dager, avhengig av typen bibliotek (se [Tabell 5](#)).

Tabell 5 Biblioteklagringstider

Bibliotektype	Plate	Antall dager	Oppbevaringstemperatur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Fragmentert gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Preanriket	ALS PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Postanriket	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Postanriket PCR	PL PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Normalisert	NL PCR	≤ 32	-25 °C til -15 °C

Advarsler og forholdsregler

Sikkerhet



ADVARSEL

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Ventilasjon skal være egnet for håndtering av farlige materialer i reagenser. Bruk verneutstyr, inkludert øyevern, hansker og laboratoriefrakk som er egnet for risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

- Håndter alle prøver som om de er smittefarlige.
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakk ved håndtering av prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og analysereagensene.

Laboratorium

- Sørg for at laboratoriet har en enveis arbeidsflyt for å hindre kontaminasjon. Preamplifiserings- og postamplifiseringsområder må ha dedikert utstyr og materiell (for eksempel dråpetellere, dråpetellerspisser, vortekser og sentrifuge). Hindre medrivning av amplifiseringsprodukt eller -probe ved å unngå å gå tilbake til preamplifiseringsområdet etter å ha gått inn i postamplifiseringsområdet.
- Utfør Indeksering av PCR og anrikings-trinnet i et postamplifiseringsområde for å hindre overføring av amplifiseringsprodukt.
- Bibliotekklargjøringsprosedyrene krever et RNase-/DNase-fritt miljø. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensmiddel. Bruk plast sertifisert til å være fri for DNase, RNase og humant genomisk DNA.
- For postamplifiseringsprosedyrer må arbeidsflater og utstyr rengjøres grundig før og etter hver prosedyre med en nylaget løsning av 0,5 % natriumhypokloritt (NaOCl). La løsningen være i kontakt med overflatene i 10 minutter, og tørk deretter grundig rent med 70 % etyl eller isopropanol.
- Bruk nukleasefrie mikrosentrifugeprøverør, plater, dråpetellerspisser og beholdere.
- Bruk kalibrert utstyr gjennom hele analysen. Kalibrer utstyret i henhold til hastighetene, temperaturene og volumene som er spesifisert i denne protokollen.
- Bruk presisjonsdråpetellere til å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Kalibrer regelmessig i samsvar med produsentens spesifikasjoner.
- Bruk følgende retningslinjer ved bruk av flerkannels dråpetellere:

- Pipetter minst $\geq 2 \mu\text{l}$.
- Kontroller at barrierespissene sitter godt og egner seg til den flerkanals dråpetellerens merke og modell.
- Fest spissene med en rullende bevegelse for å kontrollere at alle spissene festes like godt.
- Aspirer i 90° vinkel, med like væskevolumer for alle spissene.
- Bland alle komponentene etter levering ved å pipettere reaksjonsblandingen opp og ned.
- Kontroller etter dispenseringen at det ble dispensert væske helt fra hver spiss.
- Bruk utstyr som er spesifisert for analysen, og still inn programmene i samsvar med instruksjonene.
- Angitte temperaturer for termosykleren og mikroprøveinkubatoren angir reaksjonstemperatur, ikke nødvendigvis utstyrets fastsatte temperatur.

Analyse

- Unngå krysskontaminasjon.
 - Følg god laboratoriepraksis ved håndtering av prøver og reagenser.
 - Bruk nytt engangs-laboratorieutstyr og nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser.
 - Bruk aerosolresistente spisser til å redusere risikoen for krysskontaminasjon.
 - Bruk en enveis arbeidsflyt ved overgang fra preamplifiserings- til postamplifiseringsområdet.
 - Håndter og åpne bare én indeksprimer om gangen. Sett hetten tilbake på hvert indeksrør umiddelbart etter bruk. Ekstra hetter er inkludert i settet.
 - Bytt hansker ofte og hvis de kommer i kontakt med indeksprimere eller prøver.
 - Fjern ubrukte indeksprimerrør fra arbeidsområdet.
 - Ikke returner reagensene til originalrør etter bruk med remserør, kar eller beholder.
 - Bland prøver med en dråpeteller, og sentrifuger platen når dette angis.
 - Bruk en mikroplaterister. Ikke roter platene.
- Ikke bytt om analysekomponenter fra ulike reagenssettloter. Reagenssettloter identifiseres på reagenssettets eskeetikett og hovedlotark.
- God laboratoriepraksis er nødvendig for å hindre at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumenter, prøver og biblioteker. Nuklease- og PCR-produktkontaminasjon kan gi unøyaktige og upålitelige resultater.
- Riktig platetype er nødvendig for optimal analyseytelse og -oppbevaring. Følg plateoverføringsinstruksjonene i [Bruksanvisning på side 38](#).
- Dersom du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i bibliotekskvaliteten.
- Med mindre et sikkert stoppunkt er spesifisert i [Bruksanvisning på side 38](#), går du umiddelbart videre til neste trinn.

- Oppbevar analysereagensene eller -komponentene ved angitt temperatur i fastsatte pre-amplifiserings- og post-amplifiseringsområder.
- Ikke lagre reagensene på et frostfritt lager eller i dørrommene i kjøleskapet.
- Reagenser som inneholder kuler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.
- Ikke bruk reagenser som har vært oppbevart feil.
- Ikke avvik fra blandings- og håndteringsprosedyrene for hvert reagens. Utilstrekkelig blanding eller for kraftig rotasjon av reagenser kan føre til mislykkede prøveresultater.
- FSM, SSM, ERA1-B og TCB1 kan ha produktrelaterede partikler. Følg retningslinjene for håndtering for hver spesifikke reagens. Etter å ha utført FSM- og SSM-blandingstrinn, vil gjenværende hvite produktrelaterede partikler ikke påvirke ytelsen.
- Klargjør nye hovedblandinger, og kast restvolumet etter bruk.
- Klargjør alltid ny 80 % etanol med RNase-/DNase-fritt vann for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som kan påvirke resultatene. Kast 80 % etanol etter bruk i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser.
- Overfør spesifisert eluatvolum. Dersom det overføres mindre enn spesifisert eluatvolum under elueringstrinnene, kan det påvirke resultatene.
- Bruk følgende retningslinjer for ultrasonikatorer. Følg produsentens instruksjoner.
 - Plasser gDNA langsomt i ultrasonikatorrøret for å unngå å danne bobler. For mye bobler eller en luftspalte i skjæringsrøret kan føre til ufullstendig fragmentering.
 - Dispenser langsomt i ultrasonikatorrør, og unngå å sprute.
 - Væskefortrengning og prøvetap unngås hvis dråpetellerspissen ikke settes inn i bunnen av ultrasonikatorrøret når fragmentert DNA fjernes.
- Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøveinngang.
- Ikke bruk en beholder til å dispensere reagenser for trinn som krever at mindre enn 10 µl materiale tilsettes i hver prøvebrønn.
- Bruk en dråpeteller med fin spiss ved overføring av fragmentert gDNA-prøve fra ultrasonikatorrørene til Library Prep (LP)-platen.
- Ikke kombiner SUA1- og UMI-adaptore sammen.
- Bruk SUA1-adaptore med RNA-prøver.
- Bruk UMI-adaptore med DNA-prøver.
- Tilordne forskjellige indeksprimere til hver bibliotekprøve for å unikt identifisere hvert bibliotek når det pooler for sekvensering på en enkelt strømningscelle.
- Ikke kombiner indeksprimere CPxx og UPxx i samme bibliotek.

- Uoverensstemmelser mellom prøvene og indeksprimerne forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tapt positiv prøveidentifisering. Angi prøve-ID-er og tilordne indekser i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module før du starter bibliotekklargjøring. Registrer prøve-ID-er, indeksering og platebrønnoorientering for referanse under bibliotekklargjøringen.
- Bruk UPxx-indekser til biblioteker fra RNA-prøver.
- Bruk UPxx-indekser eller CPxx-indekser for biblioteker fra DNA-prøver.
- Sekvenser maksimalt 8 RNA-biblioteker og 8 DNA-biblioteker per strømningscelle. Sekvenser minst tre biblioteker. Følg retningslinjene i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 35](#).
- Gå umiddelbart videre til vasketrinnet for å hindre kulepelleter i å tørke etter bindetrinnet i [Fange mål ett på side 59](#) og [Fange mål to på side 63](#).
- Fjern alt 80 % etanol fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol har vist seg å påvirke resultatene.
- Følg det spesifiserte antallet vasker angitt i [Bruksanvisning på side 38](#) for å sikre optimal analyseytelse.
- Resuspender bibliotekkulen for å oppnå konsekvent klyngetetthet på strømningscellen under prosedyren [Normalisere biblioteker på side 69](#).
- Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og aktuelle myndigheter i landet der brukeren og pasienten befinner seg.

Prosedyremessige merknader

- TSO Comprehensive (EU)-arbeidsflyten kan gjennomføres i samsvar med følgende plan:
 - Dag 1: cDNA-syntese fra RNA-prøver, DNA-fragmentering av gDNA-prøver, bibliotekklargjøring, og starte (første) hybridisering over natten.
 - Dag 2: Anriking, normalisering av anrikede biblioteker og plassering av biblioteker på NextSeq 550Dx-instrumentet-instrumentet.Dersom det ikke er mulig å utføre TSO Comprehensive (EU)-arbeidsflyten i samsvar med denne planen, spesifiseres flere sikre stoppunkter gjennom hele protokollen. Med mindre et sikkert stoppunkt er angitt i protokollen, går du umiddelbart videre til neste trinn.
- Biblioteker fra RNA- og DNA-prøver kan klargjøres samtidig i separate brønner.
- Tabeller for klargjøring av hovedblanding omfatter volumoverskudd for å kontrollere at det er tilstrekkelig volum til antallet prøver som behandles.
- Bruk vann av molekylær kvalitet som er fritt for nukleaser.
- Skyll spissen etter reagenstilsetning ved å aspirere og dispensere én gang i den relevante brønnen på platen, når annet ikke er angitt i prosedyren.
- Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.

- Reagenser, prøver og biblioteker må oppbevares kalde ved visse trinn i bruksanvisningen. Dette er definert som å oppbevare på is eller tilsvarende.

Termosyklusprogrammer

- Programmer termosyklusprogrammer på preamplifiserings- og postamplifiseringsutstyr før protokollen startes.
- Kontroller at PCR-platene sitter godt i termosykleren.
- Bruk platene som anbefales av produsenten av termosykleren.

Forsegling av platen og fjerning av forsegling

- Alltid forsegle plater med en ny klebende plateforsegling. Forseglinger må ikke gjenbrukes.
- Forsegl platen ved å påføre klebedekselet sikkert på platen med en forseglingskile eller -rull.
- Alltid forsegl den 96-brønners platen med en ny klebende plateforsegling før trinnene i protokollen følges.
 - Plateristetrinn
 - Sentrifugeringstrinn
 - Termosyklusstrinn
 - Hybridiseringer
 - Langtidsoppbevaring
- Sørg for at kantene og brønnene er forseglet for å redusere risikoen for krysskontaminasjon og fordamping.
- Plasser platen på et flatt underlag før du langsomt fjerner forseglingen.
- Sentrifuger ved 280 x g i 1 minutt før forseglingen brytes hvis det observeres væske eller kondens på forseglingen eller sideveggene på platebrønnene.
- Bruk klebende plateforseglinger som er effektive ved -20 °C til 100 °C, og som egner seg til PCR-plater med kant eller delvis kant.

Utstyr

- Kontroller at laboratoriepersonellet er kjent med produsentens instruksjoner for drift og vedlikehold av alt utstyr før analysen startes.

Platetype og plateoverføringer

- Riktig platetype er nødvendig for optimal analyseytelse og -oppbevaring.
- Overfør det spesifiserte volumet fra hver brønn på en plate til tilsvarende brønn på målplaten ved overføring av volumer mellom plater.
- Flerkanals dråpetellere kan brukes ved overføring av prøver mellom remserør eller plater.
- Bruk følgende retningslinjer ved risting av plater.

- Bruk en platerister til å riste platene. Ikke roter platene.
- Rist PCR-platene ved 1200 o/min.
- Rist MIDI-platene ved 1800 o/min.
- Følg produsentens instruksjoner for å kontrollere at plateristeren holder platen sikkert.

Sentrifugering

- Sentrifuger ved $280 \times g$ i 1 minutt når det står i protokollen at du skal sentrifugere et kort øyeblikk.
- Sentrifuger platen ved $280 \times g$ i 1 minutt hvis det observeres væske på sidene av en brønn eller på forseglingen.

Håndtering av reagenser

- Sett lokk på alle reagensrørene umiddelbart etter bruk for å begrense fordamping og hindre kontaminasjon.
- Bring reagensene tilbake til den spesifiserte oppbevaringstemperaturen når de ikke lenger er nødvendige for en prosedyre.
- Følg reagensklargjøringen som er beskrevet før hvert prosedyreavsnitt i [Bruksanvisning på side 38](#).
- Klargjør nødvendig volum hovedblanding, elueringsblanding og 80 % etanol for det antallet prøver som behandles.
- Volumene i hovedblandings- og løsningstabellene inneholder overskudd. Følgende viser beregninger av overdoseringsvolum.
 - [Tabell 14](#)
 - Volum FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antall prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - Volum RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{antall prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - [Tabell 21](#)
 - Volum med ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,20)$.
 - Volum med ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,20)$.
 - [Tabell 29](#)
 - Volum med EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volum med HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabell 30](#)
 - Volum med EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volum med HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabell 36](#)
 - Volum med LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (2,0)$.
 - Volum med LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (2,0)$.

- [Tabell 37](#)
 - Volum med EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,25)$.
 - Volum med HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,25)$.

Adaptersett

- TSO Comprehensive (EU)-analysen inkluderer SUA1- og UMI-adaptore.
- SUA1-adaptore skal brukes med RNA-prøver. Skal ikke brukes med DNA-prøver.
- UMI-adaptore skal brukes med DNA-prøver. Skal ikke brukes med RNA-prøver.

Håndtere kuler

- Tre typer kuler er inkludert i TSO Comprehensive (EU)-analysen (SPB, SMB og LNB1). Kontroller at riktig kuletype brukes under prosedyren.
- Utfør riktig antall vasker for hver kuletype.
- Kontroller at kulene holder romtemperatur før bruk.
- Bland kulene i 1 minutt før bruk for å sikre at de er homogene.
- Bruk følgende retningslinjer ved blanding av kuler med dråpeteller:
 - Bruk en egnet dråpeteller og spisstørrelse for volumet som blandes.
 - Juster voluminnstillingen til ca. 50–75 % av prøvevolumet.
 - Pipetter sakte uten å slippe stempelet.
 - Unngå å sprute og introdusere bobler.
 - Plasser dråpetellerspissen over pelleten, og dispenser direkte i pelleten for å løsne kuler fra brønnen eller røret.
 - Kontroller at kulepelleten er helt omgitt av oppløsningen. Løsningen bør se mørkebrun ut og ha en homogen konsistens.
 - Vurder om en kulepellet er til stede. Aspirer den samlede kuleløsningen i brønnen forsiktig til spissen og se i bunnen av brønnene.
- Dersom kuler aspireres inn i dråpetellerspissene under magnetiske separasjonstrinn, må kulene dispenseres tilbake til platebrønnen på magnetstativet. Vent til væsken er klar (ca. 2 minutter) før du går videre til neste trinn i prosedyren.
- Når du vasker kuler:
 - Bruk det anbefalte magnetstativet til platen.
 - Dispenser væske direkte på kulepelleten, slik at kulene på siden av brønnene blir fuktet.
 - Hold platen på magnetstativet til prosedyren sier at den skal fjernes.
 - Ikke rør om platen mens den står på magnetstativet.
 - Kulepelleten må ikke forstyrres mens den er på magnetstativet.

- Vinkle dråpetellerspissene i bunnen av brønnene ved vask av kuler eller fjerning av supernatant for å unngå å skape et vakuum og trekke løsningen inn i dråpetellerspissfiltrene.

Antall biblioteker og valg av indekser

Planlegg antall prøvebiblioteker og prøveindekser for sekvenseringskjøringen før kjøringssoppsettet. Følgende retningslinjer for prøvenummer omfatter positive kontroller, men utelukker negative / kontroller uten mal (NTC-er). NTC-er må legges til den planlagte kjøringen som en ekstra prøve.

For TSO Comprehensive (EU), følg veiledningene i [Tabell 6](#) og [Tabell 7](#) for å bestemme antall RNA- og/eller DNA-biblioteker som skal sekvenseres på én strømningscelle. Se [Tabell 6](#) om du sekvenserer RNA- eller DNA-biblioteker separat. Se [Tabell 7](#) om du sekvenserer RNA- og DNA-biblioteker på samme strømningscelle.

Tabell 6 Sekvensering av RNA- eller DNA-biblioteker

Bibliotektype	Minimum*	Maksimum*
Bare RNA	3	16
Bare DNA	3	8

* NTC-er bidrar ikke til pleksiteten.

Tabell 7 Sekvensering av RNA- og DNA-biblioteker på samme strømningscelle

Bibliotektype	Minimum*	Maksimum*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC-er bidrar ikke til pleksiteten.

For optimal reagensbruk ved sekvensering av DNA- og RNA-biblioteker med TSO Comprehensive (EU) på NextSeq 550Dx-instrumentet, sekvensere 8 RNA-biblioteker og 8 DNA-biblioteker per strømningscelle.

Indeksprimere identifiserer hver prøve unikt, slik at bibliotekene kan pooler sammen for sekvensering på én strømningscelle. Kompatible indekskombinasjoner vises på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) under kjøringssoppsettet på Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Tilsett indeksprimere i hvert prøvebibliotek under bibliotekklargjøringen. **Bruk en ny indeksprimerblanding for hvert prøvebibliotek.**

Kontroller at indeksprimerne som brukes sammen med prøvene, samsvarer med indeksene som velges i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. **Uoverensstemmelser forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tap av positiv prøveidentifisering.**

Det er to typer indekser i TSO Comprehensive (EU)-analysen.

- **UPxx-indekser** – Bruk UPxx-indekser for biblioteker fra RNA- eller DNA-prøver.

- **CPxx-indekser** – Bruk CPxx-indekser for biblioteker fra DNA-prøver. Ikke bruk CPxx-indekser for biblioteker utledet fra RNA-prøver eller ved sekvensering av kun i alt tre DNA-biblioteker.

Når bare tre biblioteker sekvenseres, er følgende nødvendig:

- Bibliotekene må være bare DNA eller bare RNA.
- Ikke bruk CPxx-indekssett.
- Ett av følgende UPxx-indekssett er nødvendig for å sikre tilstrekkelig mangfold:
 - UP01, UP02 og UP03
 - UP04, UP05 og UP06
 - UP07, UP08 og UP09
 - UP10, UP11 og UP12

Det første biblioteket tilordnes for eksempel UP01, det andre biblioteket UP02 og det tredje biblioteket UP03.

TruSight Oncology Kontroller

TSO Comprehensive (EU) krever TruSight Oncology-kontroller, som består av TruSight Oncology-DNA-kontrollen og TruSight Oncology-RNA-kontrollen som positive kontroller. Inkluder TruSight Oncology DNA-kontrollen for hver DNA-sekvenseringskjøring og TruSight Oncology RNA-kontrollen for hver RNA-sekvenseringskjøring i hver enkelt bibliotekklargjøring (inkluder kontroller for kombinerte DNA- og RNA-kjøringer også). Det klargjøres en unik positiv kontroll per planlagt sekvensert kjøring. For mer informasjon, referer til Pakningsvedlegg for TruSight Oncology Controls (dokumentnr. 200009919).

Den positive kontrollinmatingsmengden er 40 ng for DNA og RNA.

Inkluder den egnete NTC i hver RNA- og DNA-bibliotekklargjøring. NTC sekvenseres gjentatte ganger innen én bibliotekklargjøring. Følg disse retningslinjene for TruSight Oncology-kontroller:

- Klargjør bibliotek fra positive kontroller og NTC (kontroller uten mal) på samme måte som prøvene.
- Bruk TEB til DNA NTC.
- Bruk DNase-/RNase-fritt vann til RNA NTC.
- De positive kontrollene er inkludert i maksimumskravet for biblioteket.
- NTC-ene er ikke inkludert i minimumskravet for biblioteket.
- Bruk UP-indekser til NTC ved sekvensering av kun 3 biblioteker.
- Siden NTC-en sekvenseres gjentatte ganger, kan ikke de valgte indeksene for denne kontrollen gjentas i bibliotekklargjøringen.

Følgende tabeller viser eksempler på plateoppsett for bibliotekklargjøring. Hver nummerert kolonne representerer én sekvenseringskjøring. Når DNA- og RNA-biblioteker sekvenseres sammen, representerer hvert tilsvarende kolonnesett én sekvenseringskjøring (f.eks. kolonne 1 og kolonne 7). NTC sekvenseres for hver kolonne eller hvert kolonnesett.

Tabell 8 Bibliotekklargjøring for én kjøring med seks pasientprøver

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

Tabell 9 Bibliotekklargjøring for tre kjøringer med 20 pasientprøver

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

Bruksanvisning

[Figur 1](#) og [Figur 2](#) viser en oversikt over TSO Comprehensive (EU)-arbeidsflyten.

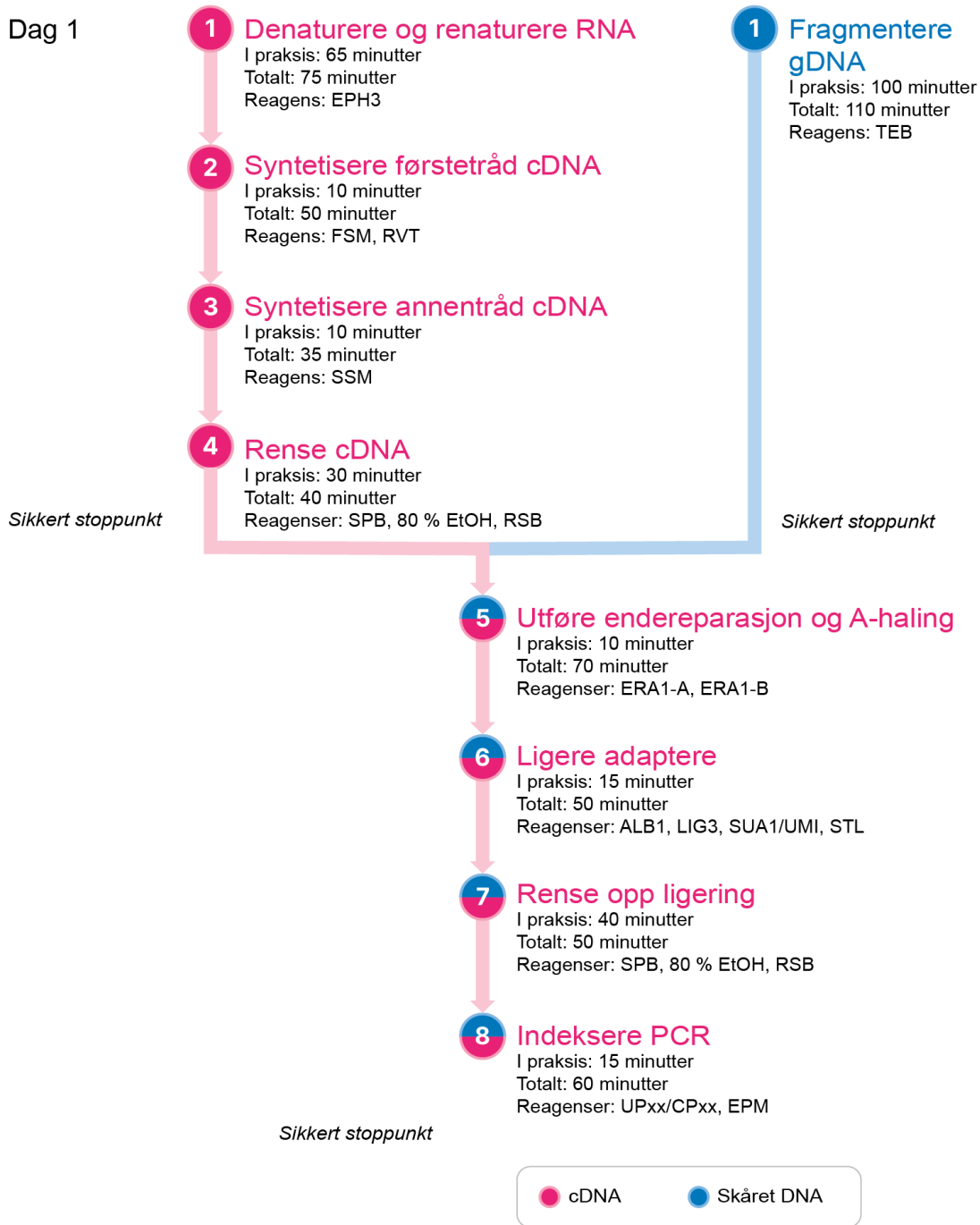
Arbeidsflyt for bibliotekklargjøring

[Figur 1](#) illustrerer arbeidsflyten for bibliotekklargjøring for TSO Comprehensive (EU). Biblioteker fra RNA- og DNA-prøver kan klargjøres samtidig i separate brønner. Positive kontroller og NCT (no template control) behandles på samme måte som prøvene. Sikre stoppunkter er merket mellom trinn.

Før protokollen startes, legg inn kjørings- og prøveinformasjon i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Referere til *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)*.

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

Dag 1



* I praksis-tider og samlede tider er omtrentlige.

Arbeidsflyt for anriking

Figur 2 illustrerer anrikingsarbeidsflyten for TSO Comprehensive (EU). Sikre stoppunkter er merket mellom trinn.

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



Programmere termosyklere

Før analysen startes, må følgende programmer lagres på termosyklerne for pre- og postamplifisering.

Tabell 10 Termosyklarprogrammer for preamplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklarparametere
Denaturere og renaturere RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C i 5 minutter • 4 °C i 1 minutt • Holdes på 4 °C
Syntetisere førstetråd cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C i 10 minutter • 42 °C i 15 minutter • 70 °C i 15 minutter • 4 °C i 1 minutt • Holdes på 4 °C
Syntetisere annentråd cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C i 25 minutter • 4 °C i 1 minutt • Holdes på 4 °C

MERK Slå av oppvarmingsalternativet for forvarmet lokk hvis lokktemperaturen for 2ndSS ikke kan settes til 30 °C.

Tabell 11 Termosyklarprogrammer etter amplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklarparametere
Indeksere PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 30 sekunder • 15 sykluser med: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • Holdes på 10 °C
Utføre første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • Holdes på 57 °C i 8 til 24 timer

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklusparametere
Utføre andre hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • Holdes på 57 °C i 1,5 til 4 timer
Amplifisere anrikt bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 30 s • 18 sykluser med: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 10 s • 60 °C i 30 s • 72 °C i 30 s • 72 °C i 5 min • Holdes på 10 °C

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.



FORSIKTIG

Alle prosedyrer i arbeidsflyten krever et RNase-/DNase-fritt miljø.

1. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensmiddel.
2. Sørg for at det er angitt termosyklusprogrammer for preamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
3. Følg produsentens instruksjoner for å sette opp ultrasonikatoren.
4. Dersom bare DNA-prøver prosesseres, gå direkte videre til [Fragmentere gDNA på side 48](#).
5. Ta RNA-kontrollene ut fra oppbevaring.
6. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

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

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
EPH3	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Denaturere og renaturere RNA
FSM	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Syntetisere førstetråd cDNA
RVT	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Syntetisere førstetråd cDNA
SSM	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Syntetisere annentråd cDNA

Tabell 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap) (PN 20031119)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SPB (lysegrønn etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Rense cDNA
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Rense cDNA

Denaturere og renaturere RNA

Denne prosessen denaturerer rensset RNA og primes med tilfeldige heksamere under klargjøring til cDNA-syntese.

Klargjøring

- Klargjør følgende reagenser:
 - EPH3 – Legg til side.
 - FSM – Bland ved å rotere. Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Reagenset kan inneholde hvite produktrelaterte partikler. Ingen brukerhandling er nødvendig. Det er ingen effekt på produksjon.
 - RVT – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevart kaldt.

MERK RVT er en viskøs løsning. Minimer bobledannelse under pipettering.

- Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å klargjøre en FSM + RVT-hovedblanding.

Tabell 14 FSM + RVT-hovedblanding*

Hovedblandingskomponent	4 biblioteker (µl)	8 biblioteker (µl)	16 biblioteker (µl)	24 biblioteker (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 33](#) for beregninger.

- Bland ved å pipettere 10 ganger.
- Oppbevar FSM + RVT-hovedblandingen kald inntil [Syntetisere førstetråd cDNA på side 44](#).

Prosedyre

- Oppbevar ekstraherte RNA-prøver og RNA-kontroller kaldt under tining. Behandle RNA-kontroller som prøver for resten av protokollen.
- Oppbevar RNA kaldt når det ikke er i bruk. Se [Prøvekrav på side 26](#) for å kvantifisere prøver.
- Bland ved å pipettere hver RNA-prøve 10 ganger.

4. Bruk RNase/DNase-free water til å klargjøre 40 ng av hver RNA-prøve i et endelig volum på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
For RNA-kontroller, bruk konsentrasjonen oppgitt på røretiketten.
5. Merk en ny 96-brønners PCR-platen CF (cDNA-fragmenter).
6. Tilsett 8,5 µl av hver RNA-prøve i en unik brønn på CF PCR-platen.
7. Kontroller at prøveplateoppsett og indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i TSO Comprehensive (EU) analysemodul under kjøringssoppsettet.
8. Bland ved å rotere EPH3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
9. Tilsett 8,5 µl EPH3 i hver prøvebrønn.
10. Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.



FORSIKTIG

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.

11. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
12. Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
13. Plasser på termosykleren, og kjør LQ-RNA programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
14. Når prøvene når 4 °C, vent i 1 minutt. Gå umiddelbart videre til neste trinn.

Syntetisere førstetråd cDNA

Denne prosessen sikrer reverse transcriptase av RNA-fragmentene som er primet med tilfeldige heksamere til førstetrådet cDNA ved hjelp av reverse transcriptase.

Prosedyre

1. Fjern CF PCR-platen fra termosykleren.
2. Pipetter 10 ganger for å blande FSM + RVT-hovedblandingen. Sørg for at FSM + RVT-blandingen er helt homogen.
3. Tilsett 8 µl FSM + RVT-hovedblanding i hver prøvebrønn.
4. Bland ved å pipettere 10 ganger.
5. Kast gjenværende FSM + RVT-hovedblanding.
6. Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
7. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
8. Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
9. Plasser på en termosyklar, og kjør 1stSS-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 41](#).

10. Gå umiddelbart videre til neste trinn når prøvene når 4 °C.
Førstetrådprøver kan holdes ved 4 °C i opptil 5 minutter.

Syntetisere annentråd cDNA

Denne prosessen fjerner RNA-malen og syntetiserer dobbelttrådet cDNA.

Klargjøring

1. Klargjør SSM:
 - a. Bland ved å vende 10 ganger.
 - b. Sentrifuger et kort øyeblikk. Reagenset kan inneholde hvite produktrelaterte partikler. Ingen handling er nødvendig. Det er ingen effekt på produksjon.

Prosedyre

1. Fjern CF PCR-platen fra termosykleren.
2. Tilsett 25 µl SSM i hver prøvebrønn.
3. Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
4. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
5. Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
6. Plasser på en termosyklus, og kjør 2ndSS-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
7. Når prøvene når 4 °C, må du vente i 1 minutt og gå umiddelbart videre til neste trinn.

Rense cDNA

Denne prosessen bruker SPB til å rense cDNA fra uønskede reaksjonskomponenter. Kulene vaskes to ganger med ny 80 % EtOH. cDNA elueres med RSB.

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - SPB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
2. Klargjør ny 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml kjegleformet rør som følger.

Tabell 15 Klargjør ny 80 % EtOH.

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

3. Bland ved å rotere ny 80 % EtOH.
4. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BIND1 (cDNA-binding).
5. Dekk til, og legg til side.
6. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Fjern CF PCR-platen fra termosykleren.
2. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
3. Tilsett umiddelbart 90 µl SPB i hver prøvebrønn på BIND1 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale etter at SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.
4. Overfør hele volumet (50 µl) av hver prøve fra CF PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND1 MIDI-platen.
5. Kast den tomme CF PCR-platen.
6. Påfør klebende plateforsegling på BIND1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
7. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
8. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
9. Plasser BIND1 MIDI-platen på et magnetstativ i 5 minutter.
10. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelletten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte.
 - a. Hold BIND1 MIDI-platen på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Uten å forstyrre kulepelletten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn.
2. Vask kulene **andre** gang.
3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EtOH fra hver brønn.

4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

1. Fjern BIND1 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Bland ved å vende eller rotere RSB.
3. Tilsett 22 µl RSB i hver prøvebrønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på BIND1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
5. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate PCF (rensede cDNA-fragmenter).
Dersom du stopper ved [SIKKERT STOPPUNKT på side 47](#), skal du bruke en PCR-plate.
9. Overfør 20 µl eluat fra hver prøvebrønn på BIND1 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PCF-platen.
10. Kast den tomme BIND1 MIDI-platen.
11. Tilsett 30 µl RSB i hver prøvebrønn på PCF-platen.
12. Pipetter for å blande 10 ganger.
13. Påfør klebende plateforsegling på PCF-platen, og oppbevar den kaldt.
14. Sett EPH3, FSM, RVT og SSM tilbake til oppbevaring.
15. Hvis du behandler prøver kun utledet fra RNA (cDNA) og ikke stopper ved det sikre stoppunktet, fortsett til [Utføre endereparasjon og A-haling på side 50](#).

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger PCF PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 7 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

1. Ta DNA-kontrollene ut fra oppbevaring.
2. Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap) (PN 20031119)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TEB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fragmentere gDNA

Fragmentere gDNA

Denne prosessen fragmenterer gDNA og genererer dsDNA-fragmenter med 3'- eller 5'-overheng.

Klargjøring

1. Følg anbefalingene i [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27](#) for å kvantifisere prøver.
2. Forbered TEB – Bland ved å vende eller rotere.

Prosedyre

Klargjøre platen

Velg ett av følgende alternativer for å klargjøre platen.

- Behandle gDNA-prøvene samtidig med cDNA-prøvene på PCF MIDI-platen.
 - a. Merk PCF MIDI-platen LP (Bibliotekforberedelse).
 - b. Oppbevar kaldt og sett til side for bruk i [Overføre fragmentert DNA på side 49](#).
- Behandle gDNA-prøvene samtidig med cDNA-prøvene, og PCF PCR-platen er fryst.
 - a. Tin PCF PCR-platen til romtemperatur.
 - b. Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
 - c. Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - d. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Bibliotekforberedelse).
 - e. Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen til tilsvarende brønn på LP MIDI-platen.
 - f. Kast PCF PCR-platen.
 - g. Påfør klebende plateforsegling, og hold kaldt for inntil [Overføre fragmentert DNA på side 49](#).
- Behandle prøver som bare inneholder gDNA.
 - a. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Bibliotekforberedelse).
Dersom du stopper ved [SIKKERT STOPPUNKT på side 49](#), skal du bruke en PCR-plate.
 - b. Dekk til og sett til side for bruk i [Overføre fragmentert DNA på side 49](#).

Fortynne gDNA

1. Tin gDNA-prøvene og DNA-kontrollene ved romtemperatur.
2. Bland ved å pipettere hver gDNA-prøve 10 ganger.
3. Sentrifuger røret et kort øyeblikk for å samle opp dråper.
4. Bland ved å vende eller rotere TEB.
5. Bruk TEB til å klargjøre hver gDNA-prøve i et endelig volum på 52 µl. Se følgende tabell for inndatamengder og minimumskonsentrasjoner basert på prøvetype.

- Analysen krever en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon for å tillate minst 40 µl TEB for 52 µl-volumet.
- For DNA-kontroller må konsentrasjonen på røretiketten brukes.
- Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøve inn i denne fortynningen for å hindre prøvetap.

Prøvetype	Innmatingsmengde (ng)	Minimum konsentrasjon (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontroll	40	Se røretiketten

Fragmentere

1. Tilsett 52 µl av hver gDNA-prøve i en separat brønn på ultrasonikatorrøret.



FORSIKTIG

Plasser gDNA langsomt i røret, og kontroller at det ikke er luftspalter i bunnen av røret. Du finner mer informasjon under [Analyse på side 29](#) og i produsentens instruksjoner.

2. Registrer strimmelens orientering.
3. Fragmenter gDNA i fragmenter med en ultrasonikator.

Overføre fragmentert DNA

1. Kontroller at prøveplateoppsettet og indeksene for hver prøve samsvarer med kjøringen du velger for analyse med TSO Comprehensive (EU) analysemodul.
2. Følg ultrasonikatorprodusentens instruksjoner for å hente ut prøven.
For noen ultrasonikatorrørtyper kan det være nødvendig med sentrifugering for å konsolidere prøven i røret.
3. For hver fragmentert gDNA-prøve brukes en dråpeteller med tynne spisser til å utføre tre overføringer av 16,7 µl til en tom brønn på LP MIDI-platen.
4. Påfør klebende plateforsegling på LP MIDI-platen.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, må du påføre en klebende plateforsegling på LP PCR-platen og sentrifugere ved 280 × g i 1 minutt. Oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 7 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt. Kontroller at det er angitt termosyklusprogrammer for postamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 41](#).

1. Klargjør en isbøtte eller tilsvarende.
2. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 17 TruSight Oncology Comp Library Prep-boks (i fryser) (PN 20031118)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
ERA1-A	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Utføre endereparasjon og A-haling
ERA1-B	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Utføre endereparasjon og A-haling
ALB1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
LIG3	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Ligere adaptere
SUA1 (blå hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
UMI (hvit hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
STL	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
EPM	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Indeksere PCR

Tabell 18 TruSight Oncology Comp Library Prep-boks (i kjøleskap) (PN 20031119)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SPB (lysegrønn etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Rense opp ligering
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Rense opp ligering

Tabell 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers-boks (PN 20031120)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
UPxx	-25 °C til -15 °C	Tin de relevante indeksprimerrørene til romtemperatur.	Indeksere PCR

Tabell 20 TruSight Oncology Comp CP-indeksprimerboks (PN 20031126)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
CPxx	-25 °C til -15 °C	Tin de relevante indeksprimerrørene til romtemperatur.	Indeksere PCR

Utføre endereparasjon og A-haling

Denne prosessen reparerer overhengene som skyldes fragmentering i ender med overhengende A-hale ved hjelp av en End Repair A-Tailing-hovedblanding (ERA1).

3'- til 5'-eksonukleaseaktiviteten til denne blandingen fjerner 3'-overhengene, og 5'- til 3'- polymeraseaktiviteten fyller ut 5'-overhengene. 3'-endene er A-halet under denne reaksjonen for å hindre at de ligger til hverandre under adapterligeringsreaksjonen.

Klargjøring

- Forvarm to mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokkinnsetser på følgende måte.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
- Klargjør følgende reagenser:
 - ERA1-A – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevart kaldt.
 - ERA1-B – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
Inspiser for utfelling. Dersom det forekommer utfelling, varm røret til 37 °C, og bland ved å pipettere, til utfellingene løses opp.
- Klargjør ERA1-hovedblandingen i et mikrosentrifugerør.

Tabell 21 ERA1 Hovedblanding*

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

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 33](#) for beregninger.

- Pipettere sakte 10 ganger for å sikre homogeneitet, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Oppbevar ERA1 mastermiks kaldt.
- Velg ett av følgende alternativer for å klargjøre platen:
 - Hvis prøvene er i en MIDI-plate, klargjør på følgende måte.
 - Merk MIDI-platen på nytt LP2 (Bibliotekforberedelse 2).
 - Dersom noen prøver finnes i separate MIDI-plater, må alle prøvene flyttes til separate brønner på samme MIDI-plate i samsvar med plateoppsettet.
 - Hvis platen er frosset, klargjør på følgende måte.
 - Tin PCF PCR-platen eller LP PCR-platen til romtemperatur.
 - Sentrifuger platen ved 280 × g i 1 minutt.
 - Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP2 (Bibliotekforberedelse 2).
 - Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen eller LP PCR-platen til tilsvarende brønn på LP2 MIDI-platen.
 - Kast PCF PCR- eller LP PCR-platen.

Prosedyre

1. Tilsett 10 µl ERA1-hovedblanding i hver prøvebrønn i LP2 MIDI-platen.
2. Kast gjenværende ERA1-hovedblanding.
3. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
4. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
5. Inkuber i den forvarmede mikroprøveinkubatoren ved 30 °C i 30 minutter.
6. Overfør umiddelbart til en andre, forvarmet mikroprøveinkubator.
7. Inkuber ved 72 °C i 20 minutter.
8. Oppbevar LP2 MIDI-platen kaldt i 5 minutter.

Ligere adaptere

Denne prosessen ligerer adaptere til endene av cDNA- og/eller gDNA-fragmentene.

TSO Comprehensive (EU)-analysen inkluderer SUA1- og UMI-adaptere.

- Bruk SUA1-adaptere med RNA-prøver.
- Bruk UMI-adaptere med DNA-prøver.

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - ALB1 – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - LIG3 – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevart kaldt.
 - SUA1 – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - UMI – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - STL – Legg til side for bruk i prosedyren.

Prosedyre

1. Fjern LP2 MIDI-platen fra is eller tilsvarende.
2. Tilsett 60 µl ALB1 i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen. ALB1 er en viskøs løsning. Pipettere sakte for å minimere bobledannelse.
3. Tilsett 5 µl LIG3 i hver prøvebrønn.
4. Tilsett adaptere som følger.
Ikke kombiner forskjellige typer adaptere.
 - [RNA-prøvebrønner] – tilsett 10 µl SUA1 (blå hette) i hver prøve fra RNA.
 - [DNA-prøvebrønner] – tilsett 10 µl UMI (hvit hette) i hver prøve fra DNA.

5. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Inkuberes ved romtemperatur i 30 minutter.
8. Bland ved å rotere STL, og sentrifuger deretter kort.
9. Tilsett 5 µl STL i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen.
10. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
11. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.

Rense opp ligering

Denne prosessen bruker SPB til å rense de adapterligerte cDNA- eller gDNA-fragmentene og fjerne uønskede produkter. Kulene vaskes to ganger med ny 80 % etanol. De adapterligerte prøvene elueres med RSB.

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - SPB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
2. Klargjør ny 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml kjegleformet rør.

Tabell 22 Klargjør ny 80 % etanol

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

3. Bland ved å rotere ny 80 % EtOH.
4. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
2. Tilsett umiddelbart 112 µl SPB i hver prøvebrønn i LP2 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale etter at SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.

3. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
4. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
5. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
6. Plasser LP2 MIDI-platen på magnetstativet i 10 minutter.
7. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Hold LP2 MIDI-platen på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver prøvebrønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn.
2. Vask kulene **andre** gang.
3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EtOH fra hver brønn.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

1. Fjern LP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Bland ved å vende eller rotere RSB.
3. Tilsett 27,5 µl RSB i hver prøvebrønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
5. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
7. Plasser LP2 MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-plate LS (Bibliotekprøver).
9. Overfør 25 µl av hvert eluat fra LP2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på LS PCR-platen.
10. Kast den tomme LP2 MIDI-platen.

Indeksere PCR

I dette trinnet amplifiseres bibliotekfragmenter ved hjelp av primere som legger til indekssekvenser for prøvemultipleksing. Produktet som oppstår, inneholder det fullstendige biblioteket av cDNA- og/eller DNA-fragmenter flankert av adaptore som kreves for klyngegenerering.

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - EPM – Oppbevar kaldt.
 - UPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger et kort øyeblikk. UPxx er indeksprimeren som ble valgt på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøringssoppsettet.
 - CPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger kort. CPxx er indeksprimeren som ble valgt på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøringssoppsettet.
2. Kontroller at indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i TSO Comprehensive (EU) analysemodul under kjøringssoppsettet. Følg instruksjonene for valg av indeks i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 35](#).



FORSIKTIG

Uoverensstemmelser mellom prøvene og indeksprimerne forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tapt positiv prøveidentifisering.

Prosedyre

1. Tilsett 5 µl av den egnede indeksprimeren (UPxx eller CPxx) i tilsvarende prøvebrønn på LS PCR-platen i samsvar med indeksene som velges.



FORSIKTIGHET

Håndter og åpne bare ett indeksprimerrør om gangen. Sett en ny hette på hvert indekstrør umiddelbart etter bruk. Ikke kombiner indekssprimere.

2. Bland ved å rotere EPM i 5 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
3. Tilsett 20 µl EPM i hver prøvebrønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på LS PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
5. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
6. Sett preamplifiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.



FORSIKTIGHET

Utfør alle etterfølgende trinn i et postamplifiseringsområde for å hindre overføring av amplifiseringsproduktet.

7. Sentrifuger LS PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
8. Plasser på den forhåndsprogrammerte termosykleren for postamplifisering, og kjør I-PCR-programmet. Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
Følg instruksjon for tining for reagenser i Klargjøre protokoll-trinnene hvis du fortsetter med [Sette opp første hybridisering på side 57](#).

9. Sentrifuger LS PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt når I-PCR-programmet er avsluttet.
10. Merk platen på nytt ALS (Forsterkede bibliotekprøver).

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, oppbevar ALS PCR-platen ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opptil 30 dager.

Klargjør for protokoll

Dette preparatet er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til hybridisering over natten.

1. Kontroller at det er angitt termosyklusprogrammer for postamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
2. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 23 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i kjøleskap) (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TCB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Tabell 24 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i fryser) (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TCA1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Tabell 25 TruSight Oncology Comp Content Set-boks (PN 20031122)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
OPR1 (rød hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering
OPD2 (hvit hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Sette opp første hybridisering

Under denne prosessen hybridiserer en gruppe oligoer til cDNA-biblioteker, og en gruppe oligoer hybridiserer til gDNA-biblioteker som er klargjort i henhold til [Indeksere PCR på side 54](#). Anriking av målrettede områder krever to hybridiseringstrinn. I den første hybridiseringen hybridiserer oligoer til cDNA- og/eller gDNA-biblioteker over natten (8 timer til 24 timer).

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - TCB1 – Varm røret ved 37 °C i 5 minutter. Roter for å blande i 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - TCA1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPR1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPD2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Tin ALS PCR-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt. Pipettere for å blande.
3. Merk en ny 96-brønners PCR-plate HYB1 (Hybridisering 1).

Prosedyre

1. Overfør 20 µl av hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-platen til tilsvarende brønn på HYB1 PCR-platen.
2. Påfør klebende plateforsegling på ALS PCR-platen, og sett den til side.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
3. Inspiser TCB1 for utfellinger. Varm røret igjen, og roter det til eventuelle krystaller løses opp.
4. Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
5. Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
6. Tilsett prober.
Ikke kombiner forskjellige typer prober. Tilsett bare ett probesett per brønn.
 - [RNA-bibliotekbrønner]–tilsett 5 µl OPR1 (rød hette) til hvert bibliotek uthentet fra RNA.
 - [DNA-bibliotek-brønner]–tilsett 5 µl OPD2 (hvit hette) til hvert bibliotek uthentet fra DNA.
7. Påfør klebende plateforsegling på HYB1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
8. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
9. Plasser på termosykleren, og kjør HYB1-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
10. Hybridiser ved 57 °C i minst 8 timer til maksimalt 24 timer.
11. Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.
12. Oppbevar ALS PCR-platen ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt. Fjern reagensrøret fra esken på begynnelsen av dag 2, og følg instruksjon for tining.

Tabell 26 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i kjøleskap) (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SMB (mørkeblå etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Fange mål ett Fange mål to
ET2	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to Normalisere biblioteker

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TCB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål to Rense amplifisert anriket bibliotek

Tabell 27 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i fryser) (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
EE2	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to Normalisere biblioteker
EEW	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Fange mål ett
TCA1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering

Tabell 28 TruSight Oncology Comp Content Set-boks (PN 20031122)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
OPR1 (rød hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering
OPD2 (hvit hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering

Fange mål ett

Dette trinnet bruker SMB til å fange prober hybridisert til de aktuelle interesseregionene. Kulene vaskes tre ganger med EEW. De anrikede bibliotekene elueres med ny EE2 + HP3-elueringsblanding og nøytraliseres med ET2.

Klargjøring

1. Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokkinnsett til 57 °C.
2. Klargjør følgende reagenser:
 - EEW – Roter for å blande i 1 minutt.
 - EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - SMB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter. Sørg for å bruke **SMB**, ikke SPB, til denne prosedyren.
 - ET2 – Legg til side for bruk i prosedyren.
3. Klargjør ny EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 29 EE2 + HP3-elueringsblanding for innhentingsmål én*

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

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 33](#) for beregninger.

- Roter EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Sett til side for trinnet [Eluere på side 61](#).
- Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP1 (Capture 1).
- Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- Fjern HYB1 PCR-platen fra termosykleren.
- Sentrifuger HYB1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
- Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Hvis presipitat eller kulepelleten er til stede, må du sørge for å nå romtemperatur, pipettere opp og ned for å frigjøre pelleten, og deretter rotere for å resuspendere.
- Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering for å tillate tilstrekkelig materiale per prøve.
- Etter at SMB er tilsatt i hver prøvebrønn, avhend alt gjenværende materiell.
- Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra HYB1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP1 MIDI-platen.
- Kast den tomme HYB1 PCR-platen.
- Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- Inkuber i den forvarmede mikroprøveinkubatoren ved 57 °C i 25 minutter.
- Plasser CAP1 MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
- Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.



FORSIKTIG

Gå umiddelbart videre til neste trinn ([Vaske på side 61](#)). Ikke la kulepelleten være lengre tid uten væske.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Fjern CAP1 MIDI-platen fra magnetstativet.
 - b. Tilsett 200 µl EEW i hver brønn.
 - c. Bruk en dråpeteller satt til 150 µl, og pipettere minst 10 ganger for å blande. Kontroller at alle kulene resuspenderes.

Kontroller at det ikke er noen kulepelletter ved å aspirere den samlede kuleløsningen i brønnen forsiktig til spissen. Inspiser bunnen av hver brønn visuelt. Hvis en kulepellet er tilstede, vinkle dråpetellerspissen mot kulepelleten under vasketrinnene for å løsne pelleten. Sørg for at kulepelleten er helt nedsenket i løsning. Løsningen bør se mørkebrun ut og ha en homogen konsistens.
 - d. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
 - e. Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
 - f. Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
 - g. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
 - h. Plasser CAP1 MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
 - i. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en **andre** gang.
3. Vask kulene en **tredje** gang.
4. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EEW fra hver brønn.

Eluere

1. Fjern CAP1 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Roter ny EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
3. Tilsett 17 µl EE2 + HP3-elueringsblanding forsiktig i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
4. Kast gjenværende EE2 + HP3-elueringsblanding.
5. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.

Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-plate ELU1 (Eluering 1).
9. Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
10. Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU1 PCR-platen.
11. Overfør 15 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU1 PCR-platen.
12. Kast den tomme CAP1 MIDI-platen.

13. Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
14. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
15. Sett EEW tilbake til oppbevaring.

Sette opp andre hybridisering

Dette trinnet binder målrettede områder av de anrikede cDNA- og/eller gDNA-bibliotekene med fangstprober en gang til. Den andre hybridiseringen sikrer høy spesifisitet for de fangede områdene. Optimal anriking av biblioteker forutsetter at det andre hybridiseringstrinnet utføres ved 57 °C i minst 1,5 timer til maksimalt 4 timer.

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - TCB1 – Varm røret ved 37 °C i 5 minutter. Roter for å blande i 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - TCA1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPR1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPD2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Prosedyre

1. Inspiser TCB1 for utfellinger. Dersom utfellinger, varm opp røret igjen og roter til krystallene løser seg opp.
2. Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på ELU1 PCR-platen.
3. Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn.
4. Tilsett den samme proben som ble brukt under den første hybridiseringen i hver brønn. Tilsett bare ett probesett per brønn.
Ikke kombiner forskjellige typer prober.
 - **[RNA-bibliotekbrønner]**–tilsett 5 µl OPR1 (rød hette) til hvert bibliotek uthentet fra RNA.
 - **[DNA-bibliotekbrønner]**–tilsett 5 µl OPD2 (hvit hette) til hvert bibliotek uthentet fra DNA.
5. Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
6. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på en termosyklus, og kjør HYB2-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
8. Hybridiser ved 57 °C i minst 1,5 timer til maksimalt 4 timer.
9. Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.

Fange mål to

Dette trinnet bruker SMB til å fange prober hybridisert til de aktuelle interesseregionene. Kulene vaskes én gang med RSB. De anrikede bibliotekene elueres med ny EE2 + HP3-elueringsblanding og nøytraliseres med ET2.

Klargjøring

1. Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokkinnsett til 57 °C.
2. Klargjør følgende reagenser:
 - EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - SMB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter. Sørg for å bruke **SMB**, ikke SPB, til denne prosedyren.
 - RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
 - ET2 – Legg til side for bruk i prosedyren.
3. Klargjør ny EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 30 EE2 + HP3-elueringsblanding for innhentingsmål to*

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

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 33](#) for beregninger.

4. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 64](#).
5. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP2 (Capture 2).
6. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Fjern ELU1 PCR-platen fra termosykleren.
2. Sentrifuger ELU1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
3. Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Hvis presipitat eller kulepelleten er til stede, må du sørge for å nå romtemperatur, pipettere opp og ned for å frigjøre pelleten, og deretter rotere for å resuspendere.
4. Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering for å tillate tilstrekkelig materiale per prøve.

- Etter at SMB er tilsatt i hver prøvebrønn, avhend alt gjenværende materiell.
- Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra ELU1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP2 MIDI-platen.
- Kast den tomme ELU1 PCR-platen.
- Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
Følg instruksjon for tining for reagenser i avsnittet [Klargjør for protokoll](#) hvis du fortsetter med trinnet [Amplifisere anriket bibliotek på side 66](#).
- Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- Hold CAP2 MDI-platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.



FORSIKTIG

Gå umiddelbart videre til neste trinn ([Vaske på side 64](#)). Ikke la kulepelleten være lengre tid uten væske.

Vaske

- Fjern CAP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
- Bland ved å vende eller rotere RSB.
- Tilsett 200 µl RSB i hver brønn.
- Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
- Sett platen på magnetstativet i 2 minutter.
- Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
- Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av RSB fra hver brønn.

Eluere

- Fjern CAP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
- Roter ny EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
- Tilsett 22 µl EE2 + HP3-elueringsblanding i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
- Kast gjenværende EE2 + HP3-elueringsblanding.
- Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.

6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-platen ELU2 (Eluering 2).
9. Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
10. Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU2 PCR-platen.
11. Overfør 20 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU2 PCR-platen.
12. Kast den tomme CAP2 MIDI-platen.
13. Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
14. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
15. Sett SMB, EE2, HP3, RSB og ET2 tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger ELU2 PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 7 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

1. Klargjør en isbøtte eller tilsvarende.
2. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 31 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i fryser) (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PPC3	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Amplifisere anrikt bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Amplifisere anrikt bibliotek

Tabell 32 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i kjøleskap) (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SPB (lysegrønn etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Rense amplifisert anrikt bibliotek
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Rense amplifisert anrikt bibliotek Klargjøre til sekvensering

Amplifisere anrikt bibliotek

Dette trinnet bruker primere til å amplifisere anrikede biblioteker.

Klargjøring

1. Tin ELU2-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger deretter ved 280 × g i 1 minutt.

Prosedyre

1. Bland ved å rotere PPC3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Tilsett 5 µl PPC3 i hver bibliotekbrønn på ELU2 PCR-platen.
3. Bland ved å rotere EPM i 5 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
4. Tilsett 20 µl EPM i hver bibliotekbrønn.
5. Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
6. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på en termosyklus, og kjør EL-PCR-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 41](#).
Følg instruksjon for tining i avsnittet [Klargjør for protokoll](#) hvis du fortsetter med [Normalisere biblioteker på side 69](#).
8. Sett PPC3 og EPM tilbake til oppbevaring.

Rense amplifisert anrikt bibliotek

Dette trinnet bruker SPB til å rense de anrikede bibliotekene for uønskede reaksjonskomponenter. Kulene vaskes to ganger med ny 80 % etanol. Bibliotekene elueres med RSB.

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - SPB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter. Sørg for å bruke **SPB**, ikke SMB, til denne prosedyren.
 - RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
2. Klargjør ny 80 % etanol i et 15 ml eller 50 ml kjegleformet rør.

Tabell 33 Klargjør ny 80 % etanol

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

3. Bland ved å rotere ny 80 % EtOH.
4. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BIND2 (rens binding).
5. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Fjern ELU2 PCR-platen fra termosykleren.
2. Sentrifuger ELU2 PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt.
3. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
4. Tilsett umiddelbart 110 μl SPB i hver bibliotekbrønn på BIND2 MIDI-platen.
5. Overfør 50 μl av hvert bibliotek fra ELU2 PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND2 MIDI-platen.
6. Kast den tomme ELU2 PCR-platen.
7. Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
8. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
9. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
10. Plasser BIND2 MIDI-platen på magnetstativet i 5 minutter.
11. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 μl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Hold BIND2 MIDI-platen på magnetstativet, og tilsett 200 μl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 μl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en **andre** gang.
3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EtOH fra hver brønn.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

1. Fjern BIND2 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Snu eller roter for å blande RSB.
3. Tilsett 32 μl RSB i hver bibliotekbrønn.

4. Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
5. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-platen PL (Rensede biblioteker).
9. Overfør 30 µl av hvert eluat fra BIND2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PL PCR-platen.
10. Kast den tomme BIND2 MIDI-platen.
11. Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen.
12. Sett SPB og RSB tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger PL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

1. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 34 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i fryser) (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
LNA1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Normalisere biblioteker
EE2	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Normalisere biblioteker

Tabell 35 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i kjøleskap) (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
LNB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Normalisere biblioteker
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Normalisere biblioteker Klargjøre til sekvensering
LNW1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Normalisere biblioteker
LNS1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Normalisere biblioteker

2. Hvis du fortsetter samme dag med [Klargjøre til sekvensering på side 72](#), følg instruksjon for tining i avsnittet [Klargjør for protokoll](#).

Normalisere biblioteker

Denne prosessen bruker LNB1 pluss tilsetningsstoffer (LNA1) til å normalisere mengden av hvert bibliotek for å sikre en ensartet bibliotekrepresentasjon i de sammenslåtte bibliotekene. Kulene vaskes to ganger med LNW1. Bibliotekene elueres med ny EE2 + HP3-elueringsblanding og nøytraliseres med LNS1.

Klargjøring

- Klargjør følgende reagenser:
 - LNB1 – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - LNA1 – Bland ved å rotere.
 - EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - LNW1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyre.
 - LNS1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyren.
- Roter LNB1 i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Vend LNB1-røret for å kontrollere at alle kulene er resuspendert.
- Bruk en dråpeteller satt til 800 µl for å pipettere LNB1 opp og ned 10 ganger for å sikre resuspensjon.
- Klargjør umiddelbart ny LNA1 + LNB1-hovedblanding i et kjegleformet rør.



FORSIKTIGHET

Resuspender LNB1-kulepelletten fullstendig i bunnen av røret for å hindre inkonsekvent klyngetetthet.

Tabell 36 LNA1 + LNB1-hovedblanding

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

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 33](#) for beregninger.

- Roter LNA1 + LNB1-hovedblandingen. Sett til side for trinnet [Binde på side 70](#).

- Klargjør ny EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 37 EE2 + HP3-elueringsblanding for Normaliser biblioteker*

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

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 33](#) for beregninger.

- Roter ny elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 71](#).
- Hvis PL PCR-platen var oppbevart, tin til romtemperatur, sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt. Pipettere for å blande.
- Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BBN (Kulebasert normalisering).
- Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- Roter LNA1+LNB1-hovedblandingen.
- Tilsett umiddelbart 45 µl LNA1 + LNB1-hovedblanding i hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen.
- Kast gjenværende LNA1 + LNB1-hovedblanding.
- Tilsett 20 µl av hvert bibliotek fra PL PCR-platen i tilsvarende brønn på BBN MIDI-platen.
- Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- Rist ved 1800 o/min i 30 minutter.
- Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen, og sett tilbake til oppbevaring.
- Plasser BBN MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
- Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelletten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.

Vaske

- Vask kuler på følgende måte:
 - Fjern BBN MIDI-platen fra magnetstativet.
 - Tilsett 45 µl LNW1 i hver bibliotekbrønn.
 - Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
 - Rist ved 1800 o/min i 5 minutter.

- e. Plasser BBN MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
 - f. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en *andre* gang.
 3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av supernatant fra hver brønn.

Eluere

1. Fjern BBN MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Roter ny EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
3. Tilsett 32 µl EE2 + HP3-løsning på hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen.
4. Kast gjenværende elueringsblanding.
5. Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-platen NL (Normaliserte biblioteker).
9. Overfør 30 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen til tilsvarende brønn på NL PCR-platen.



FORSIKTIGHET

Dersom kuler aspireres inn i dråpetellerspissene, må kulene dispenseres tilbake til platen på magnetstativet. Vent til væsken er klar (~2 minutter) før du går videre til neste trinn i prosedyren.

10. Kast den tomme BBN MIDI-platen.
11. Bland ved å rotere LNS1.
12. Tilsett 30 µl LNS1 i hver bibliotekbrønn i den nye NL PCR-platen.
13. Pipetter for å blande fem ganger.
14. Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
15. Sett LNB1, LNA1, EE2, LNW1 og LNS1 tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 32 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører frem til sekvensering.

Start klargjøring av forbruksvarer for sekvensering fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) (PN 20028871) minst en time før bruk.

1. Fjern bibliotekfortynningsbufferen (HT1) fra oppbevaring ved -25 °C til -15 °C . Tin til romtemperatur. Hold kald etter tining.
2. Følg klargjøringsinstruksjonene i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)* for andre forbruksvarer i settet.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykluser)
3. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 38 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i fryser) (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PhiX internal control (PX3 eller PhiX)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur. Hold kald etter tining.	Klargjøre til sekvensering

Tabell 39 TruSight Oncology Comp Enrichment-boks (i kjøleskap) (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Klargjøre til sekvensering
RSB (rosa etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Klargjøre til sekvensering

Klargjøre til sekvensering

Hver DNA- og RNA-sekvenseringskjøring bør inkludere en positiv kontroll og en NTC. NTC-ene for DNA og RNA sekvenseres i hvert tilfelle gjentatte ganger etter behov, slik at hver kjøring inneholder en NTC. Hver DNA- og RNA-kjøring omfatter en separat positiv kontroll.

Klargjøring

1. Gjennomgå retningslinjene for [Antall biblioteker og valg av indekser på side 35](#).
2. Merk et mikrosentrifugerør dHP3 (fortynnet HP3).
3. Merk et mikrosentrifugerør dPhiX (fortynnet PhiX).
4. Forvarm en varmeblokk til 96 °C for mikrosentrifugeprøverør.

5. Klargjør en isbøtte eller tilsvarende.

Fortynne og denaturere PhiX-kontrollen

1. Bland ved å rotere HP3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Kombiner følgende volumer i dHP3-mikrosentrifugerøret:
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase-/DNase-fritt vann-
3. Bland ved å rotere dHP3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
4. Bland ved å vende eller rotere RSB.
5. Bland ved å rotere PhiX-kontrollen, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Kombiner følgende volumer i dPhiX-mikrosentrifugerøret:
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX-kontroll
7. Tilsett 10 µl dHP3 i dPhiX-røret.
8. Kast dHP3-røret.
9. Bland ved å rotere dPhiX-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
10. Denaturer ved å inkubere dPhiX ved romtemperatur i 5 minutter.
11. Bland ved å rotere HT1.
12. Tilsett umiddelbart 980 µl forhåndskjølt HT1 i dPhiX.
13. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
14. Oppbevar PhiX kaldt til det skal brukes i klargjøringen for den andre fortynningen.
Sluttkonsentrasjonen er 20 pM dPhiX.
15. Sett PhiX, HP3 og RSB tilbake til oppbevaring.

Grupper og denaturere biblioteker for TSO Comprehensive (EU)

1. Tin NL PCR-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger deretter platen ved 280 × g i 1 minutt.
2. Bruk et flerkanals dråpetellersett ved 30 µl, og pipetter/bland bibliotekene forsiktig i NL PCR-platen 5 ganger.
Bruk nye spisser til hvert bibliotek.



FORSIKTIGHET

Sørg for å blande bibliotekbrønnene for optimal ytelse.

3. Velg ett av følgende alternativer for å gruppere, denaturere og fortynne bibliotekene.
 - **[Alternativ 1]** Sekvenser biblioteker fra RNA-prøver og DNA-prøver samtidig. Se [Alternativ 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen på side 74.](#)

- [Alternativ 2] Sekvenser bare biblioteker fra DNA-prøver. Se [Alternativ 2: Kun DNA-biblioteker på side 75](#).
- [Alternativ 3] Sekvenser bare biblioteker fra RNA-prøver. Se [Alternativ 3: Biblioteker kun for RNA på side 76](#).

Alternativ 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen

1. Merk et mikrosentrifugerør PRL (Sammenslåtte RNA-biblioteker).
2. Merk et mikrosentrifugerør PDL (Sammenslåtte DNA-biblioteker).
3. Overfør 10 µl av hvert normalisert RNA (cDNA)-bibliotek fra NL-platen til PRL-røret. Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
4. Overfør 10 µl av hvert normalisert DNA-bibliotek fra NL-platen til PDL-røret. Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
5. Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen. Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Bland ved å rotere hvert PRL- og PDL-rør.
7. Sentrifuger PRL- og PDL-rørene et kort øyeblikk.
8. Inkuber PRL- og PDL-rør i en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
9. Oppbevar PRL- og PDL-rørene kaldt i 5 minutter.
10. Bland ved å rotere PRL- og PDL-rørene, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
11. Oppbevar PRL- og PDL-rørene kaldt.

Klargjøre første fortykning

1. Merk et mikrosentrifugerør DIL1 (fortynning 1).
2. Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-røret.
3. Tilsett 5 µl PRL i DIL1-røret.
4. Kast PDL- og PRL-rørene.
5. Tilsett 475 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortykning).
6. Bland ved å rotere DIL1-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortykning

1. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (fortynning 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortykning).
5. Bland ved å rotere klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

6. Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt, og oppbevar deretter ved -25°C til -15°C i opptil 32 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Alternativ 2: Kun DNA-biblioteker

1. Merk et mikrosentrifugerør PDL (Sammenslåtte DNA-biblioteker).
2. Overfør 10 µl av hvert normalisert DNA-bibliotek fra NL-platen til PDL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
3. Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
4. Bland ved å rotere PDL-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
5. Inkuber PDL-rør i en varmeblokk ved 96°C i 2 minutter.
6. Oppbevar PDL-røret kaldt i 5 minutter.
7. Bland ved å rotere PDL-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Oppbevar PDL-røret kaldt.

Klargjøre første fortykning

1. Merk et mikrosentrifugerør DIL1 (fortynning 1).
2. Overfør 10 µl PDL til det tomme DIL1-røret.
3. Kast PDL-røret.
4. Tilsett 190 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortykning).
5. Bland ved å rotere DIL1, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortykning

1. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (fortynning 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortykning).

5. Roter klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og oppbevar deretter ved -25 °C til -15 °C i opptil 32 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Alternativ 3: Biblioteker kun for RNA

1. Merk et mikrosentrifugerør PRL (Sammenslåtte RNA-biblioteker).
2. Overfør 10 µl av hvert normalisert RNA (cDNA)-bibliotek fra NL-platen til PRL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
3. Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
4. Bland ved å rotere PRL-røret.
5. Sentrifuger PRL-røret et kort øyeblikk.
6. Inkuber PRL-rør i en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
7. Oppbevar PRL-røret kaldt i 5 minutter.
8. Bland ved å rotere PRL-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
9. Oppbevar PRL-røret kaldt.

Klargjøre første fortykning

1. Merk et mikrosentrifugerør DIL1 (fortynning 1).
2. Overfør 10 µl PRL til det tomme DIL1-røret.
3. Kast PRL-røret.
4. Tilsett 190 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortykning).
5. Bland ved å rotere DIL1, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortykning

1. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (fortynning 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.

3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1646 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:843 fortykning).
5. Roter klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Tilsett 16,7 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og lagre ved -25 °C til -15 °C i opptil 32 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Tolking av resultater

Sekvenseringsresultatene fra TSO Comprehensive (EU)-analysen rapporteres for hver prøve individuelt i en PDF-rapport og en JSON-rapport. Det genereres også en rapport om lav dybde (`LowDepthReport.tsv`) på prøvenivået.

På kjøringsnivået genereres følgende utdatafiler:

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

Bare varianter som består kvalitetskontrollen, vises i PDF- og JSON-rapportene.

For detaljert analyseinformasjon, se *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)*.

Resultater for CDx

Det er tre mulige resultater per tiltenkt bruk av CDx:

- **Positiv** – En variant eller biomarkør er påvist og klassifisert som nivå 1 (CDx).
- **Ikke påvist** – Ingen varianter eller biomarkører knyttet til den tiltenkte bruken av CDx er påvist i prøven. Tumortypen som velges for prøven, er egnet for CDx.
- **Intet resultat** – En bestemmelse av variantstatus er ikke mulig av én eller flere av følgende årsaker:
 - Den tiltenkte bruken av CDx gjaldt ikke for den testede prøven fordi tumortypen som ble valgt for prøven, ikke egner seg til tumortypen for CDx.
 - Sekvenseringskjøringen oppnådde ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene.
 - Biblioteket bestod ikke de nødvendige kvalitetskontrollspesifikasjonene.

- Den relevante nukleinsyren ble ikke kjørt.

Alle resultater av den tiltenkte bruken av CDx rapporteres i avsnittet Companion Diagnostic Results (Resultater for CDx) i JSON-rapporten. Bare tiltenkt bruk med et positivt resultat er angitt i avsnittet Companion Diagnostic Results (Resultater for CDx) i PDF-rapporten.

Tumorprofileringsvarianter

TSO Comprehensive (EU) er utviklet for å rapportere somatiske varianter ved rapportering av varianter med evidens av klinisk signifikans eller varianter med mulig klinisk signifikans. TSO Comprehensive (EU)-analyseprogramvaren bruker en KB som bestemmer om hver påvist og kvalifisert variant ([Tabell 2](#)) er klinisk signifikant eller mulig klinisk signifikant basert på evidens for terapeutiske, diagnostiske eller prognostiske tilknytninger. KB vurderer også om tilknytninger er opprettet (eller ikke) i den testede tumortypen. Tilknytninger med kreftrisiko eller mottakelighet tas ikke med i KB. Vanlige polymorfismer fjernes.

For tumorprofileringsvarianter klassifiseres positive resultater som genomfunn med dokumentert klinisk signifikans (nivå 2) eller genomfunn med potensiell klinisk signifikans (nivå 3) i henhold til installert KB og identifisert tumortype.

Kvalitetskontroller som ikke består, fører til ingen resultater for varianttypene som er relevante for metrikken for kvalitetskontroller som ikke er bestått. Se [Tabell 40](#) og [Tabell 41](#) for mer informasjon.

Tumorprofileringsposisjoner med utilstrekkelig dybde angis i rapporten Low Depth (Lav dybde) og ikke i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Kvalitetskontroll

- Informasjon om nukleinsyrekvantifisering og minimumskrav til inngangsmaterialer finnes under [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27](#).
- Sekvenseringskjøring og prøvegyldighet bestemmes automatisk og rapporteres av TSO Comprehensive (EU) analysemodul. For detaljert analyseinformasjon, se *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)*.
- TSO Comprehensive (EU)-rapporten, som er tilgjengelig i PDF- og JSON-format, oppsummerer kvalitetskontrollresultater. Rapportfilene ligger i analysemappen. Se *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)* for plassering av analysemappen (inneholder PDF- og JSON-rapporter) og kjøringssmappen.

Tabell 40 TSO Comprehensive (EU) QC-metrikk for rapportresultat

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
Sekvenseringskjøring	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Prosentandelen av avlesninger som passerer filter (PF).	Sekvenseringskjøring ugyldiggjort. Ingen resultater rapportert for noen prøve i kjøringen.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Gjennomsnittlig prosentandel av basebetegnelser med kvalitetscore på Q30 eller høyere for Avlesning 1.	Sekvenseringskjøring ugyldiggjort. Ingen resultater rapportert for noen prøve i kjøringen.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Gjennomsnittlig prosentandel av basebetegnelser med kvalitetscore på Q30 eller høyere for Avlesning 2.	
DNA-biblioteker	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 eller > 3106 med P_VALUE ≤ 0,049	En metrikk som vurderer sannsynligheten for kontaminasjon ved hjelp av VAF-en av vanlige varianter. Kontaminasjonsscore er basert på VAF-distribusjonen av SNP-er. Kontaminasjonens P-verdi brukes til å vurdere svært omarrangerte genomer. Den gjelder kun når kontaminasjonsscoren er over øvre spesifikasjonsgrense.	Ingen DNA-resultater rapportert.

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Median fragmentlengde i prøven.	Ingen TMB- eller små DNA-variantresultater rapportert.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (antall)	≥ 150	Median eksonfragment-dekning på tvers av alle eksonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Prosentandel av eksonbaser med 50X fragmentdekning.	
	USABLE_MSI_SITES (antall)	≥ 40	Antall MSI-steder som kan brukes til MSI-betegnelse (antall mikrosatellittsteder med avlesninger med tilstrekkelig spenn til å identifisere mikrosatellittustabilitet).	Ingen MSI-resultater rapportert.
	COVERAGE_MAD (antall)	≤ 0,210	Medianen av absolutte avvik fra medianen av det normaliserte antallet for hver CNV-målregion.	Ingen genforsterkningsresultater rapportert.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (antall)	≥ 1,0	Den mediane rå-bin-tellingen per CNV-mål.	
RNA-biblioteker	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Median fragmentlengde i prøven.	Ingen fusjoner eller spleisevariantresultater rapportert.

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeffisient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X er en måling av dekningsoverensstemmelsen. For hvert gen med minst 500x dekning beregnes variasjonskoeffisienten i dekning på tvers av genmassen. Denne metrikken er medianen av disse verdiene. En høy verdi indikerer et høyt variasjonsnivå og indikerer et problem i bibliotekklargjøringen, f.eks. lav prøveinnmating og/eller problem med nedtrekking av probe. Denne metrikken beregnes ved hjelp av alle avlesninger (inkludert avlesninger merket som duplikater).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (antall)	$\geq 9\,000\,000$	Det totale antallet avlesninger som kobles til målregionene. Denne metrikken beregnes ved hjelp av alle avlesninger (inkludert avlesninger merket som duplikater).	

* Tilfredsstillende resultater viser PASS (Bestått).

Tabell 41 TSO Comprehensive (EU) Kontrollmetrikk for rapportresultat

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
Positiv kontroll	Ekstern DNA-kontroll	23 av 24 spesifiserte varianter detektert	Ugyldiggjør pasientprøver manuelt basert på kontrollprøveresultater. Analysemodulprogramvaren ugyldiggjør ikke automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater.
	Ekstern RNA-kontroll	12 av 13 spesifiserte varianter detektert	
No template control (NTC)	DNA- median eksondekning for TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Ugyldiggjør pasientprøver manuelt basert på kontrollprøveresultater. Analysemodulprogramvaren ugyldiggjør ikke automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater.
	RNA-gen over median grenseverdi	≤ 1	

* Tilfredsstillende resultater viser PASS (Bestått).

- Gjenta sekvenseringskjøringer som er ugyldige.
- Gjenta bibliotekstestene med følgende resultater:
 - Kontaminerte DNA-biblioteker
 - Ugyldige RNA-biblioteker
 - Testene kan gjentas for å oppnå flere variant- eller biomarkørresultater for DNA-biblioteker som var ugyldiggjort for én, men ikke alle varianttyper.
- Positive kontroller evalueres for variantbestemmelse. Ugyldiggjør sekvenseringskjøringen manuelt hvis de positive kontrollene ikke samsvarer med spesifikasjonene for variantbestemmelse. Analysemodulprogramvaren ugyldiggjør ikke automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater.
- NTC-ene evalueres mot median eksondekning for DNA og gener over median grenseverdi for RNA. Hvis negative kontroller ikke oppfyller spesifikasjonene, ugyldiggjøres bibliotekklargjøringen og alle tilknyttede sekvenseringskjøringer manuelt. Analysemodulprogramvaren ugyldiggjør ikke automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater.
- Utfør ytterligere kvalitetskontrolltiltak i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser eller akkrediteringskrav.

Mer informasjon om å gjenta sekvenseringskjøringer eller tester av biblioteker finnes under [Feilsøking på side 83](#).

Feilsøking

Bruk følgende tabell til å feilsøke problemer i arbeidsflyten. Dersom en sekvenseringskjøring eller bibliotekklargjøring for en prøve mislykkes to ganger, kan det være nødvendig med ytterligere feilsøking. Kontakt Illumina tekniske støtte.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sekvenseringskjøringen samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene for kjøring.	<ul style="list-style-type: none"> • Feil ved pooling • Feil ved fortynning • Ufullstendig varmedenaturering av PRL/PDL • Problemer med klargjøring av sekvenseringsforbruksmaterieil (for eksempel ikke tilstrekkelig tint, kondens/avfall på strømningscelle) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72.
	<ul style="list-style-type: none"> • Feil bruk av anrikningsprober (for eksempel OPR1-prober som brukes til DNA-prøver, OPD2-prober som brukes til RNA-prøver) • Feil i arbeidsflyten for bibliotekklargjøring under eller etter første hybridiseringstrinn. 	Anrik biblioteker fra Forsterkede bibliotekprøver (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57 .
	Krav til prøveinnmating ble ikke oppfylt	Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Denaturere og renaturere RNA på side 43 eller Fragmentere gDNA på side 48 .
	Feil i arbeidsflyten for bibliotekklargjøring under eller før indeks-PCR-trinnet	Anrik biblioteker fra Forsterkede bibliotekprøver (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57 .
	Instrumentproblem	Kontakt Illumina tekniske støtte.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Feil med rapportgenerering eller generell instrumentfeil (f.eks. nettverksfeil, feil med innlasting/utlasting av reagenser, osv.)	Programvare- eller instrumentproblem	Se Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661) for hjelp med rapportgenerering. Kontakt Illumina tekniske støtte for å få mer hjelp.
DNA-biblioteket består ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene	Krav for prøveinnmating ble ikke oppfylt.	Sørg for egnet prøveinnfang, og gjenta bibliotekklargjøring fra Fragmenter gDNA-trinnet. Se Prøvekrav på side 26 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27 .
	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten	Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illumina tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. <ul style="list-style-type: none"> • Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Forsterkede bibliotekprøver (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Fragmentere gDNA på side 48.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
	CONTAMINATION_SCORE-, CONTAMINATION_P_VALUE- kriteriene er ikke oppfylt.	<p>Informasjon om hvordan krysskontaminasjon unngås, finnes under Advarsler og forholdsregler. Gjennomgå plateoppsett og bibliotekindeksing for å sikre at biblioteker med samme indeks ikke ble sekvensert sammen. Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten for påvirkede biblioteker. Se Fragmentere gDNA på side 48. Det kan ha forekommet kontaminasjon under prøveekstraksjonen. Det kan være nødvendig å gjenta ekstraksjonen for å kontrollere at prøven ikke er kontaminert.</p>
	Brukbar MSI besto ikke	<p>Gjennomgå ultrasonikatorprodusentens innstillinger for bruk og drift (herunder vannivå og rørtype). Sørg for egnet prøveinngang i analysen. Se Prøvekrav på side 26 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27. En ny prøveekstraksjon og/eller gjentakelse av Fragmentere gDNA-trinnet kan være nødvendig hvis prøven er altfor fragmentert eller skadet.</p>

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
	<p>Prøven kan være altfor fragmentert eller ha nukleinsyreskade som påvirker muligheten til å generere tilstrekkelige unike biblioteker.</p>	<p>Gå gjennom Innstillinger for ultralydinstrumentkonfigurasjon for DNA-fragmentering på side 22 og ultralydinstrumentprodusentens innstillinger for bruk og drift (inkludert vannivå og rørtype). Sørg for egnet prøveinngang i analysen.</p> <p>Se Prøvekrav på side 26 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27.</p> <p>En ny prøveekstraksjon og/eller gjentakelse av Fragmentere gDNA-trinnet kan være nødvendig hvis prøven er altfor fragmentert eller skadet.</p>
<p>RNA-biblioteket består ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene.</p>	<p>Krav for prøveinmating ble ikke oppfylt.</p>	<p>Sørg for egnet prøveinngang, og gjenta bibliotekklargjøringen fra Denaturere og renaturere RNA-trinnet.</p> <p>Se Prøvekrav på side 26 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27.</p>

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten	<p>Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illumina tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Forsterkede bibliotekprøver (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Denaturere og renaturere RNA på side 43.
	Prøven kan være altfor fragmentert eller ha nukleinsyreskade som påvirker muligheten til å generere tilstrekkelige unike biblioteker.	<p>Sørg for egnet prøveinngang. Se Prøvekrav på side 26 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 27.</p> <p>Det kan være nødvendig å ekstrahere prøven på nytt hvis den er altfor fragmentert eller skadet.</p>

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Feil i positiv kontroll (DNA/RNA)	<p>Kravene til prøveinngang for den positive kontrollen ble ikke oppfylt.</p>	<p>Sikre relevant inngang i analysen. Gjennomgå plateoppsettet, og kontroller at de riktige reagensene (prober, indekser) er i de riktige brønnene.</p> <p>Kontroller at den positive kontrollprøven oppbevares i henhold til etiketten.</p> <p>For alle prøver som deler den positive kontrollen: Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstyrfeilen oppsto. Kontakt Illumina tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil.</p>
	<p>Bruks- eller utstyrfeil i analysearbeidsflyten</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Forsterkede bibliotekprøver (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Denaturere og renaturere RNA på side 43 eller Fragmentere gDNA på side 48.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Feil i NTC (DNA/RNA)	Det forekom krysskontaminasjon eller kontaminasjon av arbeidsområdet. <hr/> Feil indeksering av bibliotek.	Gå gjennom avsnittet Advarsler og forholdsregler for informasjon om dekontaminasjon av arbeidsområder og hvordan unngå krysskontaminering. Gjennomgå plateoppsett og bibliotekindeksering for å sikre at biblioteker med samme indeks ikke ble sekvensert sammen. Gjenta bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten for alle biblioteker som deler no-template-kontroll (NTC).
Programvare indikerer at positive og/eller negative kontroller ikke var inkludert i sekvenseringskjøringen	Feil tilordning av krefttype i kjøgingsplanlegging for Local Run Manager.	Sett analysen tilbake i kø med kontroller som er riktig identifisert som instruert i Veiledning for analysemodularbeidsflyt (se <i>Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)</i>).

Ytelseskarakteristikk

TSO Comprehensive (EU) er et målrettet NGS-panel som detekterer endringer i 517 gener. Små DNA-varianter (enkeltnukleotidvarianter [SNV-er], multinukleotidvarianter [MNV-er], insersjoner og delesjoner) kan rapporteres fra alle 517 gener. Tumormutasjonsbyrde rapporteres som en score basert på en telling av somatiske varianter uten driver per megabase (se *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)* for detaljer). MSI rapporteres som en status. Genforsterkninger kan rapporteres fra MET- og ERBB2-genene. Fusjoner er kvalifisert for rapportering fra de 23 genene som er angitt i [Oppsummering og forklaring av analysen på side 1](#). Spleisevarianter kan rapporteres fra MET- og EGFR-genene. For å kunne rapporteres må varianter detekteres og ha evidens i TSO Comprehensive (EU)-analysens KB, og være kvalifisert på grunnlag av den testede vevstypen. NTRK-fusjoner krever at fusjonspartneren må være 5' og at NTRK-kinasedomenet er intakt for å kunne rapporteres.

For små DNA-varianter ble en representativ tilnærming til validering av de målrettede genene i panelet utført med data som representerer SNV-er, MNV-er, insersjoner og delesjoner. For genforsterkninger, fusjoner og spleisevarianter ble testing utført på gennivå. TMB og MSI ble evaluert der det er angitt. For CDx-kravet for NTRK-fusjoner, ble FFPE-prøver testet i studier som fokuserte på ytelse som er spesifikk for kravet (dvs. deteksjonsgrense, presisjon innen laboratoriet, reproduserbarhet, nøyaktighet og klinisk ytelse).

Tabell 42 gir definisjoner av metrikk som er beregnet i ulike studier.

Tabell 42 Metrikkdefinisjoner

Begrep	Definisjon
Positivt prosentamsvar (PPA)	Prosentandelen av positive som er korrekt identifisert av de totale positive i forhold til en ortogonal metode.
Negativt prosentamsvar (NPA)	Prosentandelen av negative som er korrekt identifisert av de totale negative i forhold til en ortogonal metode.
Samlet prosentamsvar (OPA)	Prosentandelen av positive og negative som er korrekt identifisert av de totale observasjonene i forhold til en ortogonal metode.
Prosent positiv betegnelse (PPC)	Prosentandel av observasjoner som er positive for et mål blant observasjoner som er forventet å være positive for målet.
Prosent negativ betegnelse (PNC)	Prosentandel av observasjoner som er negative for et mål blant observasjoner som er forventet å være negative for målet.
n/N	Antall positive eller negative observasjoner (n) delt på de totale observasjonene (N) for å beregne henholdsvis PPC eller PNC. Verdiene av n og N kan være på forskjellige nivåer (f.eks. variant eller gen) eller kombinert på tvers av en gruppe (f.eks. SNV-er).
Standardavvik (SD)	Et mål på variasjonsmengden av verdiene til en variabel om gjennomsnittet.
Prosent variasjonskoeffisient (%CV)	Standardavvik dividert med gjennomsnittet som en prosentandel.

Krysskontaminasjon

Krysskontaminasjonsstudien ble gjennomført for å vurdere om det forekom falske positive resultater var på grunn av brønn-til-brønn-kontaminasjon under prøvebibliotekklargjøringen og kjøring-til-kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer for -analysen. Denne analysen ble utført for små DNA-varianter (som også påvirker TMB), fusjoner, genforsterkninger og MSI. Biblioteker ble klargjort fra karakteriserte prøver i et sjakkbrettoppsett med vekslende prøver for å evaluere brønn-til-brønn-kontaminasjon, og med vekslende

indekser for å evaluere kjøring-til-kjøring-kontaminasjon ved etterfølgende sekvensering på samme NextSeq 550Dx-instrumentet. Krysskontaminasjonsstudien viste ingen kontaminasjonshendelser, noe som ble observert ved å undersøke de påviste variantene i hver prøve, med ingen påvisning av falskt positive resultater.

To kvalitetskontrollmetriker (CONTAMINATION_SCORE og P_VALUE) ble designet for TSO Comprehensive (EU)-analysen for å detektere prøvekontaminasjon i DNA-prøver. Kontaminasjonsdeteksjonssensitivitet ble evaluert. FFPE-tumor DNA-prøver ble blandet med varierende mengder FFPE normale DNA-prøver for å skape bevisst kontaminerte prøver.

Totalt ble det generert 1112 kontaminasjonsobservasjoner, og kontaminasjon ble detektert i 95 % (1054) av observasjonene. Deteksjonsraten ble økt til 96 % (939/976) når prosentandelen kontaminasjon var mellom 10 % og 90 % (masse/masse). Av de 37 observasjonene mellom 10 % og 90 % kontaminasjon der kontaminasjon ikke ble detektert, oppfylte 12 ikke dekningsspesifikasjonen for å kalle små DNA-varianter. Lav dekning hindrer kontaminasjonsdeteksjon, men små DNA-varianter er ikke rapportert å redusere noen effekt av kontaminasjon. Femten observasjoner oppfylte ikke genforsterkningsspesifikasjonen (median bin-telling av kvalitetssikringsmetrikk) for å kalle genforsterkning. Ingen resultater for genforsterkning vil bli rapportert for prøvene.

Den studiedemonstrerte TSO Comprehensive (EU)-analysen forventes å ha en lav forekomst av krysskontaminasjon fra brønn til brønn eller kjøring til kjøring. Disse resultatene sammen med kontaminasjonsmetrikkene i programvaren reduserer risikoen for falske variantresultater på grunn av prøvekontaminering.

Evaluering av ekstraksjonssett for nukleinsyre

Tre kommersielt tilgjengelige DNA- og RNA-ekstraksjonssett ble evaluert med TSO Comprehensive (EU). De tre ekstraksjonssettene isolerte både DNA og RNA fra de samme FFPE-vevssnittene. Settene hadde forskjellige deparafineringsmiddel og nukleinsyrebindingstrinn ([Tabell 43](#)). Sett 1 var det dominerende ekstraksjonssettet som ble brukt til å fastslå TSO Comprehensive (EU)-ytelsen.

Tabell 43 Settkarakteristikker

Sett	Deparafineringsmiddel	Nukleinsyrebinding
1	Proprietær	Kolonne
2	Xylen	Kolonne
3	Mineralolje	Magnetkuler

[Tabell 44](#) og [Tabell 45](#) oppsummerer effektene av ekstraksjonssett på bibliotekgyldighet og variantbetegnelse. Forskjellen ble rapportert hvis ekstraksjonssettgjennomsnittene var signifikant forskjellige. Gjennomsnittlige forskjeller mellom ekstraksjonssett ble beregnet med sett 1 som kontroll siden sett 1 ble brukt til å ekstrahere de fleste nukleinsyrene som ble brukt til TSO Comprehensive (EU) analytiske studier. Den gjennomsnittlige forskjellen i forhold til sett 1 ble rapportert for å illustrere hvordan forskjellige ekstraksjonssett ville påvirke de andre TSO Comprehensive (EU) analytiske studiene.

Tabell 44 Ekstraksjonssetteffekter på bibliotekgyldighet

Varianttype	Kvalitetskontrollmetrikk for bibliotek	Gjennomsnittlig forskjell i forhold til sett 1
DNA små varianter/TMB	Median eksondekning(antall) PCT Ekson 50X (%) Median innsatsstørrelse (bp)	Sett 2 lavere med 56 avlesninger Sett 3 høyere med 0,298 % Sett 2 og sett 3 lavere med 3 bp
DNA MSI	Brukbare MSI-steder	Sett 3 høyere med 8 steder
Genforsterkning av DNA	Dekning MAD (antall)	Sett 2 lavere med 0,0043
	Median bin-telling	Sett 2 lavere med 0,5825, sett 3 høyere med 0,3086
RNA (fusjoner/spleisevarianter)	Median innsatsstørrelse (bp)	Sett 3 høyere med 2 bp
	Logg (median CV Gene500X)	Sett 2 høyere med 0,029
	Totalt på målavlesninger	Ingen signifikant forskjell

Ekstraksjonssett 2 og sett 3 ble observert å ha økte støtteavlesninger slik at fusjoner og spleisevarianter nær LoD har en høyere sannsynlighet for deteksjon på grunn av valg av ekstraksjonssett.

Tabell 45 Ekstraksjonssetteffekter på variantbetegnelse

Varianttype (enheter)	Variantbetegnelse (gjennomsnittlig forskjell i forhold til sett 1)
Små DNA-varianter (VAF)	Ikke teknisk signifikant Målrrettede varianter: mellom sett-variens var liten i forhold til rest Ikke-målrrettede varianter: Ingen signifikante forskjeller for de to første VAF-kassene. Ingen meningsfulle forskjeller når statistisk signifikans observeres.
TMB (mutasjon per megabase)	Ikke teknisk signifikant, variens mellom-sett var liten i forhold til rest
MSI (% ustabile steder)	Sett 3 lavere med 1,9 % ustabile steder
Genforsterkning (foldendring)	Sett 2 (0,06) og sett 3 (0,08) høyere foldendring
Fusjoner (støtteavlesninger)	Sett 2 hadde 51 % og sett 3 hadde 23 % økning i støtteavlesninger
Spleisevarianter (støtteavlesninger)	Sett 2 og sett 3 hadde 48 % økning i støtteavlesninger

Forstyrrende stoffer

Effekten av potensielle endogene og eksogene stoffer på TSO Comprehensive (EU)-analysens ytelse ble evaluert. Endogene stoffer (melanin og hemoglobin) ble tilsatt i prøvene under nukleinsyreekstraksjonsprosessen. Eksogene stoffer (etanol, xylen og proteinase K) var til stede under nukleinsyreekstraksjonsprosessen, og de ble også tilsatt i den rensede nukleinsyren før bibliotekklargjøring. Der

det ble observert forstyrrelse med tilsatt proteinase K, ble økte konsentrasjoner av proteinase K under ekstraksjonsprosessen også evaluert. Overflødig indeksprimere (15 % og 30 %) ble tilsatt under bibliotekklargjøring. Bortsett fra indeksprimere, ble stoffer tilsatt FFPE-prøver fra hjerne-, bryst-, kolon-, lunge-, medullær skjoldbruskkjertel-, NSCLC-, eggstokk-, prostata-, spytt-, hud-, bløtvevs- og skjoldbruskkjertelvev – åtte prøver ble ekstrahert for DNA-analyse, og 13 ble ekstrahert for RNA-analyse. For indeksprimere ble seks FFPE-prøver fra tre forskjellige vevstyper (skjoldbruskkjertel, blære, kolon) brukt til DNA-analyse, og fem FFPE-prøver fra fire forskjellige vevstyper (lunge, skjoldbruskkjertel, kolon, bryst) ble brukt til RNA-analyse. Det var en ikke-tilsatt endogen kontroll, og buffer eller vanntilsatt eksogen kontroll for hver av de 16 unike prøvene. Effekten av nekrose ble vurdert på et annet sett med åtte FFPE-prøver fra hjerne-, kolon- og lungevev. Det var en makrodissekert, ingen nekrose-kontroll for hver nekroseprøve. For alle forstyrrelser ble fire replikater per prøve per stoff testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med deres respektive kontrolltilstand for deteksjon av små DNA-varianter, genforsterkninger, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter, samt for MSI-status og TMB-score. Både CDx- og tumorprofileringsvarianter ble inkludert.

Deteksjon av DNA-variant

Melanin (0,2 µg/ml), hemoglobin (2 mg/ml), etanol (5 %), proteinase K (0,04 mg/ml i nukleinsyre) og xylene (0,0001 %) forstyrrer ikke TMB-score, MSI-status, små DNA-varianter og genforsterkninger.

Deteksjon av RNA-variant

Dataene støtter ingen interferens fra melanin (0,2 µg/ml), etanol (5 %) og xylene (0,0001 %) på RNA-fusjoner eller -spleisevarianter. Hemoglobin (2 mg/ml) forstyrrer (reduserte støtteavlesninger) med tre forskjellige spleisevarianter i MET-genet. En spleisevariant i AR-genet (tre forskjellige prøver) og én i EGFR-genet (én prøve) ble ikke påvirket. Hvis laboratoriet kjører RNA med analysen, skal vev med hemoglobin unngås eller minimeres ved innhenting av snitt fra vevsblokken.

Proteinase K (0,04 mg/ml i nukleinsyre) forstyrrer med RNA-fusjoner og -spleisevarianter. Proteinase K ble testet ved 2,6 mg/ml og 5,2 mg/ml under ekstraksjonsprosessen, som er 2x og 4x standardkonsentrasjonen i et kommersielt tilgjengelig sett. Fusjoner ble hemmet ved 4x, men ikke 2x proteinase K. Spleisevarianter ble hemmet ved 2x proteinase K. Proteinase K eller tilsvarende enzym bør ikke økes under ekstraksjon fra standardkonsentrasjonen tilveiebrakt i et ekstraksjonssett.

Spleisevariantstøtteavlesninger reduseres med 30 % overskytende indeksprimere, men ikke med 15 % overskudd.

Nekrose

Tilstedeværelse av nekrotisk vev opptil 70 % forstyrrer ikke TMB-score, MSI-status eller små DNA-varianter. RNA-varianter (støtteavlesninger) og påvisning av genforsterkning (foldendring) ble redusert i prøver med henholdsvis ≥ 25 % og ≥ 23 % (etter område) nekrotisk innhold i vevsområdet. Hvis prøvesnittet inneholder ≥ 23 % nekrose i totalt vevsområde, må det nekrotiske vevet makrodissekteres.

Stabilitet

Sanntidsstabilitet

Sanntidsstabilitet ble brukt til å fastsette TSO Comprehensive (EU)-analysesettets holdbarhet ved oppbevaring i henhold til etiketten. Studiedesignen var basert på testing av tre reagenspartier og brukte den klassiske stabilitetsstudiedesignen beskrevet i CLSI EP25-A. Settene ble oppbevart i endelig settkonfigurasjon for varigheten av studien ved oppbevaringsvilkår i henhold til produktetiketten. Frosne settkomponenter ble oppbevart ved -15 °C til -25 °C. Nedkjølte settkomponenter ble oppbevart ved 2 °C til 8 °C.

Sett ble testet for utseende og funksjonelle settfrigivelseskriterier på spesifiserte tidspunkter. I tillegg ble trender for kvalitetskontrollmetrikk for variantbetegnelse og prøver analysert for kvalitetskontrollmaterialet. Holdbarhet ble fastslått for hvert reagens. Utløpsdatoene tilordnes basert på produksjonsdato og holdbarhet. Settene utløpsdato angis på grunnlag av reagenset med den tidligste utløpsdatoen.

Settets stabilitet i bruk

TSO Comprehensive (EU)-analysesettets stabilitet i bruk ble evaluert under standard bruksvilkår under holdbarhetstiden for å støtte bruk av flere sett. Reagenssettet ble fryst/tint flere ganger og testet for å kunne bruke settet opptil 4 ganger. 8 RNA- og 8 DNA-biblioteker ble dessuten klargjort i alt 3 ganger for å teste største antall biblioteker som støttes (24 DNA- og 24 RNA-biblioteker per sett). Alle funksjonelle settfrigivelseskriterier ble oppfylt for alle testede fryse-/tinesykluser og tidspunkter. Testing av FFPE-prøver med reagenser i alderen ≥ 25 måneder ble utført for å vurdere effekten av testing i bruk på variantbetegnelse. En kvalitativ analyse av målrettede varianter viser at hendelsene i bruk ikke påvirket variantbetegnelse.

Nukleinsyrestabilitet

Stabiliteten til nukleinsyrer (DNA og RNA) og deres tilknyttede kvantifisering for bruk med TSO Comprehensive (EU)-analysen ble evaluert ved hjelp av FFPE-prøver fra flere vevstyper. FFPE-blokker ble snittet, og alle nukleinsyrer ble ekstrahert samtidig. Ekstrahert nukleinsyre ble grundig blandet, kvantifisert, kontrollert for nukleinsyre kvalitet og alikvotert i to sett med engangsrør som skulle fryses for to tidspunkter: T0-kontroll (baselinje) og T1-test (≥ 28 dager). Alt ekstrahert RNA ble oppbevart ved -85 °C til -65 °C, og alt ekstrahert DNA ble oppbevart ved -25 °C til -15 °C i de angitte tidslengdene, og deretter behandlet gjennom TSO Comprehensive (EU)-analysen over flere replikater og operatører. T1-testbetingelsen ble sammenlignet med kontrollen for MSI-status, TMB-score, genforsterkninger, små DNA-varianter, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter. Dataene indikerer at nukleinsyrer og deres tilhørende kvantifisering for bruk med TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i opptil 28 dager når de oppbevares ved anbefalte temperaturer (RNA ved -85 °C til -65 °C og DNA ved -25 °C til -15 °C).

Bibliotekstabilitet

Stabiliteten til biblioteker som bruker hvert av de seks sikre stoppepunktene for analysen (se [Tabell 5](#)), ble evaluert ved hjelp av FFPE-prøver fra flere vevstyper. Kontrollbiblioteker (T0, ingen stoppepunkter) ble sekvensert umiddelbart på slutten av arbeidsflyten. Alikvoter fra de samme bibliotekene ble holdt ved

stoppepunktene ved -25°C til -15°C for tiden (T1) for å støtte dagene oppført i [Tabell 5](#). T1 ble sammenlignet med T0 for små DNA-varianter, TMB, genforsterkninger, MSI, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter med CDx- og tumorprofileringsvarianter. Dataene indikerer at biblioteker generert fra TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i henhold til bruksanvisningen.

Stabilitet for objektglassmontert FFPE-vev

Stabiliteten til objektglassmonterte FFPE-vev for bruk sammen med TSO Comprehensive (EU)-analysen ble evaluert ved å snitte FFPE-blokker (5 μm snitt) fra flere unike prøver, montert på objektglass, etterfulgt av oppbevaring ved romtemperatur for (22°C) for 2 tidspunkter. RNA ble ekstrahert og oppbevart ved -65°C til -85°C , og DNA ble ekstrahert og oppbevart ved -15°C til -25°C i mindre enn 1 uke før testing. Nukleinsyremateriale ble kvantifisert og deretter behandlet gjennom TSO Comprehensive (EU)-analysen innen 24 timer for hvert tidspunkt. På hvert tidspunkt ble flere replikater og operatører per prøve testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen, og sammenlignet med T0-tidspunktet for MSI, TMB, genforsterkninger, små DNA-varianter, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter inkludert CDx- og tumorprofileringsvarianter. Variantbetegnelse ble vurdert og oppfylte alle akseptkriterier, noe som indikerer at objektglassmonterte FFPE-vev for bruk med TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile ved romtemperatur i opptil 4 uker (28 dager). Det bemerkes at en 10 % reduksjon i MSI-bibliotekets QC-gyldighetsrate ble detektert etter 4 uker (28 dager) på grunn av en kombinasjon av operatør- og lagringstid. RNA-fusjoner og spleisevarianter hadde en omtrent 29 % reduksjon i støtteavlesninger etter oppbevaring på objektglass i 4 uker (28 dager).

Guardbanding ved innmatingstitrering av nukleinsyre

Nukleinsyreinnføring for TSO Comprehensive (EU)-analysen ble evaluert ved å teste DNA fra 33 FFPE-prøver som omfattet 17 vevstyper ved innmatingnivåer fra 10 ng til 500 ng, og ved å teste RNA fra 5 FFPE-prøver fra 5 vevstyper ved innmatingnivåer fra 10 ng til 85 ng. Kvalitetskontrollmetrikk for bibliotek ble evaluert og var prøveavhengig. DNA-resultatene viste at noe, men ikke all kvalitetskontrollmetrikk for DNA-prøver reagerer på økt innmating over den nominelle innmatingen på 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE reagerte ikke på innmating over 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE viste en positiv korrelasjon med økning i innmating.
- PCT_EXON_50X økte med økning i innmating opptil 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES økte med økning i innmating. Noen prøver med færre enn 40 USABLE_MSI_SITES ved 40 ng oppfylte spesifikasjonen ved høyere innmatinger, noe som ville gjøre det mulig å beregne en MSI-score.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET økte med økning i innmating.
- Økning av innmating for å øke COVERAGE_MAD mot den øvre spesifikasjonsgrensen.

Kvalitetskontrollmetrikk for RNA-prøver økte (MEDIAN_INSERT_SIZE og TOTAL_ON_TARGET_READS) eller reduserte (MEDIAN_CV_GENE_500X) fra 10 ng til 40 ng, men endret seg generelt ikke ved innmating mellom 40 ng og 85 ng.

Grense for blank

Prosentandel av testresultater som er negative (av de totalt forventede negative) ble vurdert ved hjelp av normalt eller godartet, tilliggende FFPE-vev som ikke skulle inneholde somatiske varianter for små DNA-varianter, genforsterkninger, MSI, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter. Falskt positive ble ikke analysert for TMB, da det ikke er noen klinisk cutoff. Seks DNA FFPE-prøver og seks RNA FFPE-prøver ble kjørt i to eksemplarer av to operatører på tre dager for hver av de to reagenslotene. Et delsett av prøver ble regruppet og resekvensert i et format med bare 3x DNA og et format med bare 3x RNA for å evaluere falskt positive med flere multiplekse konfigurasjoner støttet av denne enheten. Det var dessuten ytterligere 30 RNA-prøver som ble kjørt dobbelt og behandlet med 1 reagensparti, delt mellom 2 operatører. Det var i alt 168 mulige observasjoner for DNA og 228 observasjoner for RNA redusert på grunn av ugyldige biblioteker for hver varianttype. Prosentandelen av falskt positive ble beregnet på gennivå for forsterkninger og på posisjonsnivå (ca. 1,9 millioner posisjoner) for små DNA-varianter. Prosentandelen av falske positiver for DNA-varianttyper er vist i [Tabell 46](#). TSO Comprehensive (EU) har ingen CDx-påstander (nivå 1) for små DNA-varianter, så ingen små DNA-varianter kan rapporteres som falske positiver for nivå 1. De 271 falske positive ble utjevnet av TSO Comprehensive (EU)-kunnskapsbasen. Ingen falske positive var klinisk signifikante (nivå 2). Det var 4 falske positiver i nivå 3 som følge av 2 varianter på tvers av 4 (2,4 %) observasjoner av de 168 observasjonene. Andelen falskt positive for RNA-fusjoner og spleisevarianter var 0 % som vist i [Tabell 47](#).

Tabell 46 Falskt positive etter DNA-varianttype

Varianttype	Falskt positive
Genforsterkninger	0 % (0/9912)
Små DNA-varianter	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Ikke tilgjengelig*

* Falske positive er ikke relevant fordi TMB rapporteres som en score og ikke har et kvantitativt utfall.

Tabell 47 Falskt positiv etter RNA-varianttype

Varianttype	Falskt positive
Fusjon	0 % (0/227)
Spleisevariant	0 % (0/227)

Deteksjonsgrense

To studier ble gjennomført for å vurdere deteksjonsgrensene for TSO Comprehensive (EU). Studie 1 evaluerte små DNA-varianter for RET, RET-fusjoner og NTRK1-3-fusjoner. Studie 2 evaluerte andre tumorprofileringsvarianter.

Studie 1

Deteksjonsgrensene (LoD-ene) for små DNA-varianter av NTRK1, NTRK3 og RET, samt NTRK1-3- og RET-fusjoner, ble fastslått. LoD er den laveste analyttverdien (f.eks. variantallelfrekvens eller støtteavlesninger) som kan detekteres konsekvent (95 % deteksjonsgrense eller en type II-feil på 5 %). FFPE-vev med små RET-DNA-varianter (medullær skjoldbruskkjertelkreft), RET-fusjoner (papillær skjoldbruskkjertelkreft, atypisk Spitz tumor) og NTRK1-3-fusjoner (lavgradig gliom, glioblastoma multiforme, myofibroblastisk sarkom, sarkom, sekretorisk brystkreft, tykktarmskreft), samt en FFPE-behandlet cellelinje med små DNA-varianter av NTRK1 og NTRK3 ble brukt i studien. Hver prøve ble fortynnet til minst fem testnivåer (fra ca. 0,01 til 0,10 VAF for små DNA-varianter og ca. 2–25 støtteavlesninger for fusjoner). Det var 18 observasjoner for hvert testnivå per lot per variant generert av tre operatører og tre sekvenseringsinstrumenter som startet bibliotekklargjøring på tre ikke-påfølgende dager med to replikater av hvert prøvetestnivå. To reagensloter ble testet.

For DNA-varianter ble de to lotene analysert hver for seg ved hjelp av probit-regresjon eller treffratetilnærmingen (laveste testnivå med en treffrate (punkttestimat) ≥ 95 %) for å bestemme LoD for hver variant etter lot. Den større LoD på tvers av de to reagenslotene ble tatt som deteksjonsgrense for varianten (Tabell 48).

For RNA-fusjoner ble FFPE-cellelinjer brukt til å estimere LoD-verdiene for hvert fusjonsgen. LoD-ene ble deretter verifisert med FFPE-vev ved hjelp av to eksemplarer av bibliotekklargjøring mellom tre operatører, tre instrumenter og tre reagensloter for å generere 54 observasjoner per variant i nærheten av LoD fastsatt med FFPE-cellelinjer. De påståtte deteksjonsgrensene for hver fusjon (Tabell 49) er de laveste gjennomsnittlige støtteavlesningene som nådde en treffrate (punkttestimat) ≥ 95 %.

Tabell 48 Deteksjonsgrense for små DNA-varianter av NTRK1, NTRK3 og RET

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

¹ Chr = Kromosom

² Disse DNA-variantene ble analysert med probit-regresjon, mens de andre variantene ble analysert med treffratetilnærmingen.

Tabell 49 Deteksjonsgrense for NTRK- og RET-fusjoner

Gen	Fusjon	Deteksjonsgrense (støtteavlesninger)
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

Studie 2

Det ble foretatt evaluering av deteksjonsgrensene (LoD-ene) for variantene av tumorprofilering rapportert av TSO Comprehensive (EU). LoD er den laveste analyttverdien (f.eks. variantallefrekvens, foldendring eller støtteavlesninger) som kan detekteres konsekvent (95 % treffrate eller en type II-feil på 5 %). FFPE-prøver fra 17 vevstyper som inneholdt varianter, ble fortynnet til flere testnivåer. Seks observasjoner ble generert per nivå av to operatører som hver brukte forskjellig reagenslot og instrument.

DNA-varianter

LoD-ene for 10 klasser av små DNA-varianter (25 varianter totalt) og to DNA-genforsterkninger (ERBB2 og MET) ble fastslått og oppsummert som områder (Tabell 50). RET-varianter fra studie 1 LoD er også inkludert. To av tre insersjoner større enn 5 bp hadde LoD-er på 0,034 og 0,036 VAF, mens den tredje hadde en LoD på 0,215 VAF. Sistnevnte hadde en insersjon i en region med lav kompleksitet der insersjonen legger til ekstra repetisjoner, påvirker innretting og krever flere avlesninger for konsekvent deteksjon. Noen genomiske kontekster med lav kompleksitet kan derfor påvirke deteksjon av insersjoner > 5 bp.

Tabell 50 Deteksjonsbegrensning for små DNA-varianter og genforsterkninger

Type (måleenhet for LoD)	Variantklasse / genomisk kontekst	Antall varianter	Område (VAF)
Små DNA-varianter (variantallel - frekvens)	SNV-er	5	0,016–0,064
	MNV-er	3	0,022–0,048
	Insertjon (1–2 bp) nær homopolymerrepetisjoner	2	0,086–0,104
	Insertjon (1–2 bp) nær dinukleotidrepetisjoner	2	0,038–0,051
	Insertjon (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertjon (> 5 bp og opptil 25 bp)	3	0,034–0,215
	Delesjon (1–2 bp) nær homopolymerrepetisjoner	2	0,094–0,100
	Delesjon (1–2 bp) nær dinukleotidrepetisjoner	2	0,033–0,070
	Delesjon (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Delesjon (> 5 og opptil 25 bp)	2	0,047–0,055
Genforsterkninger (foldendring)	Etter gen (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analyse av ikke-målrettede varianter ble utført fra studie 1-prøver som hadde minst fem testnivåer. Hver ikke-målrettede variant ble analysert individuelt og en LoD estimert kun for varianter med minst ett nivå > 0 % og ≤ 95 % treffrate, og minst ett nivå ≥ 95 % treffrate. Tabell 51 viser persentiler sammen med minimum og maksimum LoD-er observert etter klasse for de ikke-målrettede variantene. De ikke-målrettede variantene gir flere varianter etter klasse enn det som ble testet i studie 2 og er i samsvar med LoD-områdene fra Tabell 50.

Tabell 51 Sammenendragsstatistikk for deteksjonsgrenser etter klasse av ikke-målrettede varianter (fra studie 1)

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

Fusjoner

LoD-er ble fastslått for 19 fusjoner, som sto for 20 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet, som varierte fra 9 til 31,3 støtteavlesninger (Tabell 52). Tre ekstra gener (NTRK 1–3) ble testet i den andre studien. RET-genet ble testet for her og i den andre studien. Seksten fusjoner med LoD-er som ble påvist, hadde data som var i overensstemmelse med en vanlig LoD på 16 støtteavlesninger ved bruk av en tosidig, 95 % øvre konfidensgrense (UCL). To fusjoner hadde LoD-er på 24,7 og 31,3 støtteavlesninger som ikke var i overensstemmelse med den vanlige LoD-en.

Fusjonen FGFR2-SRPK2 med en LoD-verdi på 24,7 støtteavlesninger hadde gjentatte overlappingsområder i bruddpunktet som angitt av TSO Comprehensive (EU)-analyseprogramvaren. Gjentatte regioner innenfor et bruddpunkt har vanligvis lavere nivåer av evidens, ettersom avlesninger kan tilordne andre steder i genomet eller kan forbli ikke innrettet. I tillegg gjør repeterte regioner assembleringsprosessen (som brukes til å identifisere fusjonssekvenser) mer utfordrende og krever ytterligere evidens for å konstruere den riktige sekvensen. SEPT14-EGFR er et annet eksempel på en fusjon med homolog sekvens i bruddpunktet.

Fusjonen BCL2-IGHJ5 med en LoD-verdi på 31,3 støtteavlesninger har et veldig kort gen (IGHJ5) med bruddpunktet nær starten av et ekson som krever korte innrettinger med luftgap. Følgelig var det nødvendig med flere avlesninger for å oppnå konsekvent deteksjon.

Tabell 52 Deteksjonsgrense for fusjoner

Fusjon	Bruddpunkt for gen A	Bruddpunkt for gen B	LoD	Vanlig LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	ja
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	ja
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	ja
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	ja
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	ja
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ja
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	ja
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ja

Fusjon	Bruddpunkt for gen A	Bruddpunkt for gen B	LoD	Vanlig LoD
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	ja
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	ja
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nei
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	nei
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	ja

Spleisevarianter

De to RNA-spleisevariantene MET og EGFR hadde LoD-er på henholdsvis 18,7 og 16,7 støtteavlesninger.

Tumorinnhold

Resultatene i studien informerer om anbefalinger for tumorinnhold for kliniske prøver. Generelt sett er det slik at jo større tumorinnhold, desto høyere er «signalet» (VAF, foldendring eller støtteavlesninger) for varianter i tumoren. Anbefalinger for minimum tumorinnhold er basert på observasjonene som følger. LoD-verdier for små DNA-varianter er ikke større enn 0,104 VAF (med unntak av TP53-insersjonen). For å detektere driver-mutasjoner i tumoren (0,50 variantallelfrekvens), anbefales 20 % tumorinnhold, slik at disse mutasjonene vil ha 0,10 VAF og være ved eller over LoD. Ved 20 % tumorinnhold vil gener forsterket til 5,5 foldendring (11 kopier) bli detektert konsekvent basert på en deteksjonsgrense på 1,8 foldendring. Ved 20 % tumorinnhold vil fusjoner med 74 støtteavlesninger bli detektert konsekvent basert på en deteksjonsgrense på 14,7 støtteavlesninger.

Reproduserbarhet

To studier ble utført for å evaluere reproduserbarhet for TSO Comprehensive (EU)-analysen. Studie 1 evaluerte små DNA-varianter for RET i tillegg til NTRK- og RET-fusjonsvarianter. Studie 2 evaluerte ekstra tumorprofileringsvarianter.

Studie 1

Denne studien ble utført for å vurdere reproduserbarheten til TSO Comprehensive (EU)-analysen på tvers av tre teststeder (ett internt, to eksternt) med to operatører per sted, to replikater innenfor en kjøring og tre ikke-påfølgende testdager. Testing ble utført med et reproduserbarhetspanel inkludert DNA-prøver som inneholdt

spesifikke kjente små DNA-varianter for RET og RNA-prøver som inneholdt spesifikke kjente NTRK1-3- og RET-fusjonsvarianter fra formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) vevsprøver og cellerlinjer. Panelet inneholdt DNA- og RNA-panelmedlemmer med lave variantnivåer og høye variantnivåer, med samme antall panelmedlemmer på lavt og høyt nivå for hver variantklasse. Panelmedlemmer på høyt nivå ble målrettet mot ca. 2 til 3 ganger LoD, og panelmedlemmer på lavt nivå ble målrettet mot ca. LoD. På hvert sted testet hver operatør panelmedlemmene i to eksemplarer tre ganger, noe som genererte seks observasjoner per mål per panelmedlem. Fra alle de 3 stedene ble det generert 36 observasjoner per panelmedlem (3 steder/instrumenter × 2 operatører × 2 replikater innenfor kjøring × 3 startdager).

Prosent positive betegnelser (PPC-er) og prosent negative betegnelser (PNC-er) for målrettede små DNA-varianter og målrettede RNA-fusjonsvarianter på høyt nivå ble fastslått som primære endepunkter. PPC-ene og PNC-ene for målrettede små DNA-varianter og målrettede RNA-fusjonsvarianter på lavt nivå ble beregnet som sekundære endepunkter. Tosidige 95 % konfidensintervaller (CI-er) forbundet med alle endepunkter ble beregnet ved hjelp av Wilson-scoremetoden. Primære analyser ble utført for å estimere PPC og PNC (med tilhørende 95 % CI-er) i de målrettede panelmedlemmene på høyt nivå ved å kombinere TSO Comprehensive (EU)-analyseobservasjoner for et gitt mål i en gruppe panelmedlemmer som representerer den aktuelle variantklassen (f.eks. små DNA-varianter og RNA-fusjoner) på tvers av steder/instrumenter, operatører og kjøring. For hver målrettet variant ble TSO Comprehensive (EU)-analyseobservasjoner i andre panelmedlemmer på høyt nivå målrettet for samme varianttype, men som ikke inneholdt samme variant som ble fastslått av majoritetsregelen, kombinert til beregnet PNC. Samlet PPC og PNC for målrettede panelmedlemmer på lavt nivå ble fastslått på en lignende måte.

Små DNA-varianter for RET

For panelmedlemmer med små DNA-varianter på høyt nivå var samlet PPC 100,0 % (207/207; 95 % CI: 98,2 % til 100,0 %) ([Tabell 53](#)). Samlet PNC for panelmedlemmer med små DNA-varianter på høyt nivå var 100,0 % (1035/1035; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %) ([Tabell 54](#)). For målrettede panelmedlemmer med små DNA-varianter på lavt nivå var samlet PPC for de målrettede panelmedlemmene med små DNA-varianter på lavt nivå 99,1 % (210/212; 95 % CI: 96,6 % til 99,7 %), og samlet PNC var 100,0 % (1026/1026; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %).

Tabell 53 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av små DNA-varianter for RET i målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

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

¹ Forkortelser: N/A, ikke tilgjengelig, VAF, variantallelefrekvens.

² 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 54 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av små DNA-varianter for RET i målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variantnivå	Varianttype	Målrettet variant (nukleotid)	Målrettet variant (aminoesyre)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Delesjon	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insersjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Alt lite DNA varianter høy	Alt lite DNA varianter høy	Alt lite DNA varianter høy	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)
	Delesjon	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insersjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Alt lite DNA varianter lav	Alt lite DNA varianter lav	Alt lite DNA varianter lav	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Alle observasjoner samlet fra variantkombinasjoner for panelmedlemmer der majoritetsbetegnelsen er negativ (målrettede varianter som inneholder fusjoner med mindre enn 50 % positive betegnelser).

² 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 55 viser varianskomponentanalysen av resultater for variantallelfrekvenser (VAF-er) på tvers av de ca. 36 observasjonene for hvert panelmedlem. Standardavvik (SD) og prosent variasjonskoeffisient (% CV, samlet og for hver kilde) ble beregnet og vist for hver målrettet små DNA-variant for RET.

Tabell 55 Varianskomponentanalyse for TSO Comprehensive (EU)-analyse for VAF i målrettede panelmedlemmer med små DNA-varianter

Variantnivå	Varianttype	Målrettet variant (nukleotid)	Målrettet variant (Aminosyre)	Nei	Gjennomsnittlig VAF	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Replikat-SD (% CV)	Totalt 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)
	Delesjon	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)
	Inversjon	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)
	Delesjon	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)
	Inversjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)

NTRK 1–3- og RET-fusjoner

For RNA-fusjonspanelmedlemmene på høyt nivå var samlet PPC 99,3 % (285/287; 95 % CI: 97,5 % til 99,8 %) (Tabell 56). PPC var 100 % for hvert panelmedlem på høyt nivå, bortsett fra BCAN-NTRK1-panelmedlemmet (PPC = 94,4 % (34/36; 95 % CI: 81,9 % til 98,5 %)). Samlet PNC for RNA-fusjonspanelmedlemmene på høyt nivå var 100,0 % (1724/1724; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %) (Tabell 57). For målrettede RNA-fusjonspanelmedlemmer på lavt nivå var samlet PPC 95,4 % (272/285; 95 % CI: 92,3 %, 97,3 %), og samlet PNC var 100,0 % (1851/1851; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %).

Tabell 56 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av NTRK- og RET-fusjoner i målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variantnivå	Målrettet fusjon	Nei	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
~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 fusjoner høy	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 fusjoner lav	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95 % tosidig konfidensintervall (CI) beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 57 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av NTRK- og RET-fusjoner i ikke-målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variantnivå	Målrettede fusjoner	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % CI 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 fusjoner – høy	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 fusjoner – lav	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Alle observasjoner samlet fra variantkombinasjoner for panelmedlemmer der majoritetsbetegnelsen er negativ (målrettede varianter som inneholder fusjoner med mindre enn 50 % positive betegnelser).

² 95 % tosidig konfidensintervall (CI) beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 58 viser varianskomponentanalysen av støtteavlesninger på tvers av de ca. 36 observasjonene innenfor hver målrettet fusjon. SD og % CV (totalt og for hver kilde) ble beregnet og vist for hver målrettet fusjon.

Tabell 58 TSO Comprehensive (EU) Varianskomponentanalyse for -analyse av støtteavlesninger i målrettede RNA-fusjonspanelmedlemmer

Variantnivå	Fusjon	Nei	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Replikant-SD (% CV)	Totalt 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)

Studie 2

En andre studie ble utført for å vurdere reproduserbarheten til TSO Comprehensive (EU)-analysen på tvers av tre teststeder (to eksterne og ett internt), to operatører/instrumenter per sted, tre unike reagensloter, fire testdager (ikke-etterfølgende) og to sekvenseringskjøringer per prøvebibliotek.

Testingen ble utført ved å bruke ekstraherte DNA- og RNA-prøver fra 41 FFPE-vevsprøver og én FFPE-cellelinje (der én FFPE-vevsprøve og FFPE-cellelinjen ble brukt til å opprette to panelmedlemmer hver). Vevsprøver besto av følgende typer: blære, bein, hjerne, bryst, tykktarm, jejunum, nyre, lever, lunge, eggstokk, prostata, hud, bløtvev, mage, skjoldbruskkjertel og livmor. Totalt 44 panelmedlemmer ble testet, inkludert DNA-panelmedlemmer med små DNA-varianter (SNV-er, MNV-er, insersjoner og delesjoner), genforsterkninger, forskjellige TMB-score, høye MSI-score og RNA-panelmedlemmer med genfusjoner og spleisevarianter. De fleste panelmedlemmer hadde kjente målvarianter på nivåer på omtrent to til tre ganger den variantspesifikke deteksjonsgrensen (~2–3× LoD).

LoD er analyttkonsentrasjonen der observerte analyseresultater er «positive» (variant oppdaget i forhold til TSO Comprehensive (EU)-analysegrensen) ≥ 95 % av tiden. Gjennomsnittlige observerte variantnivåer ble kategorisert som ca. $<2 \times$ LoD (observerte variantnivåer ved $< 1,5 \times$ LoD), $\sim 2-3 \times$ LoD (observerte variantnivåer ved $1,5 \times$ LoD til $3,4 \times$ LoD) og ca. $>3 \times$ LoD (observerte variantnivåer ved $> 3,4 \times$ LoD).

Prosent positive betegnelser (PPC-er) for små DNA-varianter, genforsterkninger, MSI høy (MSI-H) og RNA-varianter ble beregnet ved å kombinere observasjoner på tvers av sekvenseringskjøringer og -steder. Prosent negative betegnelser (PNC-er) ble på samme måte beregnet for små DNA-varianter, genforsterkninger og RNA-varianter. For hver kjent målvariant ble TSO Comprehensive (EU)-analyseobservasjoner i panelmedlemmer av samme varianttype, men som inneholdt andre varianter, ikke var avledet fra samme kildeprøve og som heller ikke oppfylte majoritetsregelen for denne varianten (< 50 % av betegnelse var positive), kombinert på tvers av steder, operatører/instrumenter, dager, reagensloter og sekvenseringskjøringer for å beregne PNC. Tosidige 95 % konfidensintervaller (CI-er) ble beregnet ved hjelp av Wilson-scoremetoden.

Små DNA-varianter

Tabell 59 viser PPC-er for målrettede små DNA-varianter. PPC-er varierte fra 91,3 % for en BRAF SNV til 100 % for de fleste små DNA-varianter.

Tabell 59 PPC of TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av små DNA-varianter i kombinerte målrettede panelmedlemmer

Observert variantnivå ¹	Varianttype	Målrettet variant (nukleotid)	Målrettet variant (aminosyre)	Gjennomsnittlig VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
~2-3x LoD	DELESJON	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2-3x LoD	DELESJON	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3,100, 0)
~2-3x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2-3x LoD	DELESJON	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC_A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)

Observerte variantnivå ¹	Varianttype	Målrettet variant (nukleotid)	Målrettet variant (amino-syre)	Gjennomsnittlig VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
~2-3x LoD	DELESJON	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELESJON	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTION (Inserasjon)	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variantnivå beregnet fra gjennomsnittlig observerte varianttallet.

² Gjennomsnittlig varianttallet beregnet fra observerte analyseresultater.

³ 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

PNC-er var 100 % på tvers av små DNA-varianter.

Tabell 60 viser varianskomponentanalysen av resultater for VAF-resultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer med målrettede små DNA-varianter.

Tabell 60 Varianskomponentanalyse av VAF for målrettede små DNA-varianter

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

Det var to målrettede små DNA-varianter der antall observasjoner var for lite til at en varianskomponentmodell kunne tilpasses. For disse to målrettede variantene var de totale SD-ene 0,027 for varianten chr1_27024001_C_CG og 0,001 for varianten chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genforsterkninger

Tabell 61 viser PPC-er for målrettede genforsterkninger. PPC-er var 100,0 % for MET og 100,0 % for ERBB2.

Tabell 61 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av genforsterkninger i kombinerte målrettede panelmedlemmer

Observert variantnivå ¹	Målrettet variant	Gjennomsnittlig observert foldendring ²	Prosent positiv betegnelse (%)	95 % CI ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Variantnivå beregnet fra gjennomsnittlig observert foldendring.

² Gjennomsnittlig foldendring beregnet fra observerte analyseresultater.

³ 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

PNC-er var 100 % på tvers av genforsterkninger.

Tabell 62 viser varianskomponentanalysen av foldendringresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer med målrettede genforsterkninger.

Tabell 62 Varianskomponentanalyse av foldendring for målrettede genforsterkninger

Målrettet variant	Nei	Gjennomsnittlig foldendring	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabell 63 viser PPC-er for målrettede MSI-High-panelmedlemmer. PPC-er var 100 % for begge MSI-High-panelmedlemmer.

Tabell 63 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av MSI-H-status i kombinerte målrettede panelmedlemmer

Panelmedlem	Gjennomsnittlig MSI-score ¹	Nei	Prosent positiv betegnelse (%)	95 % CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Alle medlemmer		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Gjennomsnittlig observert MSI-score beregnet fra observerte analyseresultater.

² 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 64 viser varianskomponentanalysen av MSI-scoreresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer som er målrettet for MSI-High-status.

Tabell 64 Varianskomponentanalyse av MSI-score for målrettede MSI-High-panelmedlemmer

Panelmedlem	Nei	Gjennomsnittlig MSI-score	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt 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

For å evaluere reproduserbarheten til TMB-score ble det utført en kvantitativ analyse av scoren i målrettede TMB-panelmedlemmer, som representerte en rekke forventede TMB-score. Tabell 65 viser varianskomponentanalysen av TMB-scoreresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i TMB-panelmedlemmene. Totale SD-er for TMB-score var 1,0 (% CV = 13) for ett panelmedlem (gjennomsnittlig TMB-score = 7,6) og 1,1 (% CV = 2) for et annet panelmedlem (gjennomsnittlig TMB-score = 63,2).

Tabell 65 Varianskomponentanalyse av TMB-score for målrettede TMB-panelmedlemmer

Panelmedlem*	Nei	Gjennomsnittlig TMB-score	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

* Det var ett TMB-panelmedlem der antall observasjoner var for lite (N = 2) til at en varianskomponentmodell kunne tilpasses. For dette panelmedlemmet var samlet SD 1,7.

RNA-varianter

Tabell 66 viser PPC-er for målrettede RNA-varianter. PPC-er varierte fra 91,7 % for KIF5B-RET til 100 % for de fleste RNA-varianter.

Tabell 66 PPC of TSO Comprehensive (EU) -analyse for deteksjon av RNA-varianter i kombinerte målrettede panelmedlemmer

Observert variantnivå ¹	Varianttype	Målrettet variant	Gjennomsnittlige støtteavlesninger ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
> 3x LoD	Fusjon	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusjon	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusjon	CD74- ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusjon	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3x LoD	Fusjon	DHX8;ETV4- STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusjon	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusjon	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusjon	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusjon	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)

Observert variantnivå ¹	Varianttype	Målettet variant	Gjennomsnittlige støtteavlesninger ²	PPC (%) (n/N)	95 % CI ³
< 2x LoD	Fusjon	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fusjon	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Spleisevariant	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3x LoD	Spleisevariant	Utelatelse av MET-ekson 14	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Variantnivå beregnet fra gjennomsnittlige observerte støtteavlesninger.

² Gjennomsnittlige støtteavlesninger beregnet fra observerte analyseresultater.

³ 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

PNC var 100 % for hver målettet RNA-variant, bortsett fra FGFR2-SRPK2-fusjonen (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % CI: 98,96 % til 99,84 %).

Tabell 67 viser varianskomponentanalysen av støtteavlesningsresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer med målrettede RNA-varianter.

Tabell 67 Varianskomponentanalyse av støtteavlesninger for målrettede RNA-varianter

Målrettet variant	Nei	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt 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)
TMPPRS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII-spleisevariant	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Utelatelse av MET-ekson 14-spleisevariant	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Presisjon innen laboratoriet

To studier ble utført for å evaluere presisjon innen laboratoriet for TSO Comprehensive (EU). Studie 1 evaluerte NTRK- og RET-fusjoner og små DNA-varianter for RET. Studie 2 evaluerte TMB og MSI.

Studie 1

Presisjon innen laboratoriet ble evaluert for NTRK1–3-fusjoner (lavgradig gliom, glioblastoma multiforme, myofibroblastisk sarkom, sekretorisk brystkreft), RET-fusjoner (skjoldbruskkjertelkreft og hudvev fra en ukjent kreft) og små DNA-varianter av RET (medullær skjoldbruskkjertelkreft) med FFPE-vev fra de angitte krefttypene. Hver prøve ble testet på to variantnivåer: ~1x LoD (lavt variantnivå) og ~2–3x LoD (høyt variantnivå) med unntak av prøven med CCDC6-RET, som kun ble testet på lavt variantnivå. Hver av prøvene på hvert testnivå ble kjørt i to eksemplarer i hver bibliotekklargjøring på tvers av tre (3) operatører. Hver operatør

startet bibliotekklargjøring på tre (3) ikke-påfølgende startdager og sekvenserte på tre (3) utpekte NextSeq 550Dx-instrumenter. Tre (3) reagensloter ble testet, noe som genererte 54 observasjoner per nivå. Noen nivåer hadde færre enn 54 observasjoner som følge av ugyldige biblioteker.

Kvalitativ analyse

Den kvalitative konkordansen til variantbetegnelse ble evaluert hver for seg for de to variantnivåene for en gitt variant fra sammenslåtte observasjoner på tvers av alle variabler (operatører, reagensloter, instrumenter, dager og replikater). Prosent positive betegnelser (PPC) og prosent negative betegnelser (PNC) og tilhørende tosidig 95 % konfidensintervall (Wilson-score) er oppsummert i [Tabell 68](#) (små DNA-varianter) og [Tabell 69](#) (RNA-fusjoner).

På det høye variantnivået (~2–3x LoD) demonstrerte TSO Comprehensive (EU)-analysen 100 % for PPC og PNC for alle testede varianter.

På det lave variantnivået (~1x LoD) varierte PPC for små DNA-varianter fra 83,3 % til 98,1 %, og PPC for RNA-fusjoner varierte fra 90,7 % til 100 %. For varianter med PPC < 95 % var gjennomsnittlige VAF-er (RET C634Y og RET D898_E901del) eller støtteavlesninger (NCOA4-RET og BCAN-NTRK1) under de respektive deteksjonsgrensene. På det lave variantnivået ble 100 % PNC oppnådd for alle varianter.

Tabell 68 Kvalitative resultater for målrettede DNA-varianter

Variantnivå	Variant	Varianttype	Gjennomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELESJON	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*	DELESJON	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

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

* Nukleotidendringer er oppført for hver variant i delen Deteksjonsgrense, bortsett fra RET D631_L633delinsE som er kromosom 10, posisjon 43609940, referanse ACGAGCT, alternativ A.

Tabell 69 Kvalitative resultater for målrettede RNA-fusjoner

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

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

Kvantitativ analyse

Varianskomponentanalyse for begrenset maksimal sannsynlighet (REML) ble utført for å evaluere total variasjon for den underliggende kontinuerlige variabelen (VAF for små DNA-varianter og støtteavlesninger for RNA-fusjoner) og estimere komponentene for presisjon (standardavvik (SD), variasjonskoeffisient (CV)) for hver variasjonskilde (operatører, instrumenter, dager, reagensloter, rester og totalt). Resultatene vises i [Tabell 70](#) for små DNA-varianter og [Tabell 71](#) for RNA-fusjoner.

Variasjonen i VAF økte med gjennomsnittet som forventet for en binomial andel. Variasjonen i støtteavlesninger økte med gjennomsnittet som forventet med antalldata. Restkomponenten var den største bidragsyteren til total varians for både små DNA-varianter og RNA-fusjoner på begge nivåer, noe som støtter konklusjonen om at deteksjon av disse variantene av TSO Comprehensive (EU) er robust for operatører, loter, instrumenter og dager.

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

VAF-nivå	Variant	Varianttype	N gyldige forsøk	Gjennomsnittlig VAF	Operatør-SD (% CV)	Instrument-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Rest-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELESJON	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	DELESJON	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	DELESJON	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	DELESJON	52	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

Tabell 71 Kvantitative SD- og CV-resultater for målrettede RNA-fusjoner

Støtteavlesningsnivå	Fusjon	N gyldige forsøk	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Operatør-SD (% CV)	Instrument-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Rest-SD (% CV)	Totalt 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 (cellelinje)	54	23,1	4,55 (20)	1,18 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,73 (29)	8,21 (36)
	KANK1-NTRK3	54	13,5	0,74 (5)	0,11 (1)	1,09 (8)	0,00 (0)	4,22 (31)	4,42 (33)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,67 (13)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,67 (13)	5,09 (38)	5,61 (42)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,00 (0)	1,14 (6)	5,44 (29)	0,00 (0)	6,17 (33)	8,30 (44)
	KIF5B-RET (prøve 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
KIF5B-RET (prøve 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)	

Støtteavlesningsnivå	Fusjon	N gyldige forsøk	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Operatør-SD (% CV)	Instrument-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Rest-SD (% CV)	Totalt 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 (cellelinje)	54	28,3	7,93 (28)	1,02 (4)	0,00 (0)	0,00 (0)	9,05 (32)	12,08 (43)
	KANK1-NTRK3	54	39,2	5,10 (13)	0,00 (0)	4,78 (12)	0,00 (0)	9,44 (24)	11,74 (30)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,05 (12)	0,00 (0)	5,92 (24)	0,00 (0)	6,78 (27)	9,50 (38)
	KIF5B-RET (prøve 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (prøve 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studie 2

Presisjon innen laboratoriet ble evaluert for TMB og MSI. Fem NSCLC FFPE DNA-prøver for TMB og syv CRC FFPE-prøver for MSI, inkludert både MS-Stable og MSI-High, ble brukt til å evaluere presisjon på forskjellige nivåer på tvers av scoreområdet. Hver av prøvene ble kjørt i to eksemplarer på tvers av tre (3) operatører, tre (3) dager, med tre bibliotekklargjøringer for tre (3) reagensloter ved hjelp av tre (3) NextSeq 550Dx-instrumenter, noe som genererte 54 observasjoner per nivå.

Kvalitativ konkordans ble evaluert for MSI-status. TSO Comprehensive (EU)-analysen viste 100 % konkordans for prosent positive betegnelser og prosent negative betegnelser for MSI-status. For TMB rapporterer TSO Comprehensive (EU)-analysen en TMB-score. Kvalitativ konkordans er ikke aktuelt.

Den totale variasjonen i TMB- og MSI-scorer, sammen med bidraget etter kilde (instrumenter, operatører, loter, dager og rester), ble kvantifisert ved å bruke en varianskomponentmodell på tvers av en rekke scorere. Standardavviket (SD) og variasjonskoeffisienten (CV) vises i [Tabell 72](#) for TMB og [Tabell 73](#) for MSI etter nivå. Noen nivåer hadde færre enn 54 observasjoner som følge av ugyldige biblioteker.

Tabell 72 SD- og CV-resultater for kvantitativ TMB-score

Nivå	Gjennomsnittlig TMB-score	N gyldige forsøk	Operatør-SD (% CV)	Instrument-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Rest-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabell 73 SD- og CV-resultater for kvantitativ MSI-score

MSI-status	Nivå	Gjennomsnittlig MSI-score (%)	N gyldige forsøk	Operatør SD (% CV)	Instrument-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Rest-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
MS stabil	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-høy	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)

Variasjonen i TMB-scorer har en tendens til å øke med gjennomsnittet som forventet fra teoretiske fordelinger av antalldata. Variasjonen i MSI-score for nivåer nær MSI-score = 50 er større enn variasjonen i MSI-score nærmere 0, eller 100 i samsvar med variasjon fra teoretiske fordelinger av andelsdata. Restkomponenten forble den største bidragsyteren til total varians for både MSI- og TMB-score, noe som støtter konklusjonen om at scorene er robuste for operatører, loter, instrumenter og dager. Ettersom både MSI og TMB er komplekse biomarkører, kan imidlertid analytisk ytelse variere fra prøve til prøve. Det vil si at TMB-variasjon avhenger ikke bare av TMB-verdien, men også av sammensetningen av varianter i prøven, f.eks. varianttype (SNV, indel) og VAF-nivå (nærhet til cutoff for inklusjon). På samme måte avhenger MSI-variasjonen ikke bare av MSI-verdien, men også av sammensetningen av stedene i prøven, f.eks. antall steder som er ustabile, og mengde ustabilitet per sted.

C5- og C95-verdier rundt cutoff på 20,00 % ble fastslått for MSI ved hjelp av en presisjonsprofil (Tabell 74).

Tabell 74 C5-C95-intervall for MSI

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

Påvirkningen av tumorinnhold på TMB- og MSI-score ble evaluert. For de fleste prøvene hadde tumorinnhold ≥ 30 % ubetydelig påvirkning på TMB-score over ca. 10 mutasjoner per megabase. TMB-score forble relativt uendrede med økende tumorinnhold. For MSI-High-prøver viste tumorinnhold en positiv, lineær korrelasjon med MSI-score. MSI-Highprøver forble gjennomsnittlig MSI-High når tumorinnhold var ≥ 30 %.

Endometrieprøver oppførte seg distinkt annerledes enn de andre vevstypene og ble funnet å trenge en større mengde tumorinnhold for å bli betegnet som MSI-High.

Nøyaktighet for tumorprofilering

Deteksjon av varianter ved TSO Comprehensive (EU)-analyse ble sammenlignet med resultatene av referansemeter. Små DNA-varianter og TMB ble sammenlignet med en ekstern validert sekvenseringsmetode (NGS) for et helt eksom. Genforsterkninger ble sammenlignet med den samme NGS-metoden for helt eksom eller en validert dobbel in situ-hybridiseringsmetode (DISH) for HER2-forsterkninger. MSI ble evaluert mot en validert MSI-PCR-test. RNA-spleisevarianter ble sammenlignet med en validert

kvantitativ PCR-metode (qPCR). ROS1- og ALK-fusjoner ble sammenlignet med validerte FISH-analyser. Alle andre fusjoner ble sammenlignet mot en sammensatt metode bestående av en validert NGS-analyse av helt RNA-eksom (RNGS1), et målrettet NGS-panel (RNGS2) og dråpedigital PCR (ddPCR).

Deteksjon av liten DNA-variant

Deteksjon av små DNA-varianter av TSO Comprehensive (EU)-analysen ble sammenlignet med resultater av sekvensering av hele genomer (WES) som bruker WES med samsvarende prøvepar for tumor/normal for kimbanebetegnelse og somatisk betegnelse av små varianter. Sammenligning av små varianter bestående av enkelt nukleotidvarianter (SNV-er), insersjoner og delesjoner var basert på 124 prøver fra 14 forskjellige vevstyper som var gyldige for både TSO Comprehensive (EU) og WES. TSO Comprehensive (EU), men ikke WES-analysen, kan detektere multinukleotidvarianter (MNV-er, 2–3 bp) som krever fasing. TSO Comprehensive (EU) MNV-er ble evaluert som individuelle SNV-er mot WES. Et sammendrag av konkordans på variantnivået omfattende positivt prosentsamsvar (PPA) og negativt prosentsamsvar (NPA) for alle variantbetegnelser finnes i [Tabell 75](#).

Tabell 75 Konkordanssammendrag for betegnelse av små varianter evaluert etter kimbanestatus eller somatisk status

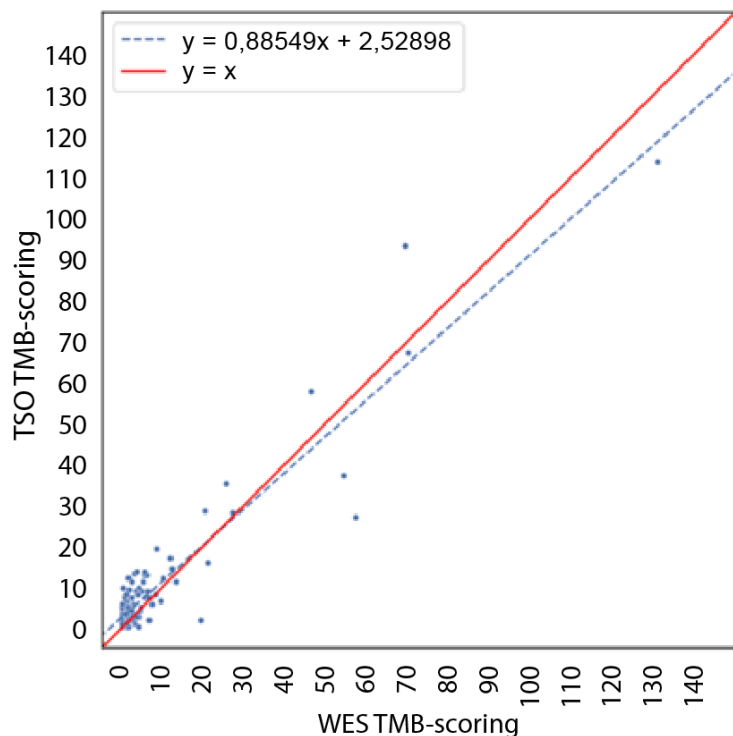
	WES somatisk betegnet	WES Germline betegnet	WES ikke betegnet
TSO Comprehensive (EU) betegnet	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) ikke betegnet	69	61	70 000 481
Totalt	451	33 224	70 000 907
Prosentamsvar	PPA: 85 % (382/451), 95 % CI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95 % CI: (99,8 %, 99,9 %)	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95 % CI: [99,999 %, 99,999 %]

Totalt betegnet TSO Comprehensive (EU) 426 somatiske varianter som ikke ble detektert med WES-metoden. To hundre og fire (48 %) av disse variantene hadde variantalfrekvenser under terskelen for betegnelse i WES-metoden. Av de resterende potensielle falskt positive variantene var det evidens for variantbetegnelsen i WES-metoden med lav støtte. Dessuten hadde mange av variantene WES-evidens på lavt nivå i de samsvarende normale prøvene. Dette antyder at disse variantene ble oversett i tumoren av WES på grunn av kontaminasjon ved tumor i normal.

Deteksjon av tumormutasjonsbyrde

TMB-konkordans ble fastslått ved å sammenligne TMB-score (somatiske mutasjoner / megabase) mellom WES-metoden og TSO Comprehensive (EU) for 124 prøver med tilgjengelige data fra både TSO Comprehensive (EU) og WES. Lineær regresjonsanalyse med WES som prediktor hadde et y-skjæringspunkt på 2,53, en helning på 0,89 og Pearsons korrelasjonskoeffisient på 0,94 (Figur 3).

Figur 3 TMB-scorekorrelasjon mellom WES og TSO Comprehensive (EU)



Deteksjon av genforsterkning

Deteksjon av genforsterkning av TSO Comprehensive (EU)-analysen ble sammenlignet med resultatene fra samme WES-analyse ved hjelp av enten samsvarende prøver for tumor/normal eller prøver med bare tumor. Totalt var det 420 prøver hvorav 183 brukte den ortogonale metoden for tumor/normal og 237 brukte metoden for bare tumor. Av de 420 prøvene ble 50 prøver valgt for studien fordi de var amplifikasjonspositive med TSO Comprehensive (EU) eller en forgjengeranalyse. Ytelsen til disse karakteriserte prøvene ble justert ved hjelp av en gjennomsnittlig fusjonsprevalens. Den kombinerte ytelsen på tvers av karakteriserte og ukarakteriserte prøver brukte et inversvariansvektet gjennomsnitt. Prøvene var fra 14 vevstyper og inneholdt amplifikasjoner fra 55 gener. TSO Comprehensive (EU) rapporterer genforsterkninger fra MET- og ERBB2-genene. Nøyaktighet ble imidlertid vurdert for alle 55 gener. Et sammendrag av genforsterkningsbetegnelse finnes i [Tabell 76](#).

Tabell 76 Sammenndrag av samsvar for genforsterkninger

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

* Konfidensintervall beregnet av bootstrap.

ERBB2 (HER2)-forsterkninger i mage- og brystvev ble analysert separat fra andre genforsterkninger ved å bruke en dobbel in situ-hybridiseringsmetode (DISH). Totalt ble 116 bryst- og mageprøver, hvorav 64 tidligere var karakterisert som HER2-positive ved IHC eller FISH, testet. Én prøve besto ikke i ekstraksjon, 4 prøver besto ikke validitet for TSO Comprehensive (EU), og 3 prøver besto ikke validitet for DISH-analyse. Av de 108 prøvene hadde 20 (18,5 %) score i grenseland (mellom 1,5 og 2,5) nær cutoff for DISH på 2,0. Konkordansresultater inkludert PPA, NPA for alle prøver, samt ekskluderende grensetilfeller av HER2 DISH-tilfeller vises i [Tabell 77](#).

Tabell 77 Sammenndrag av konkordans mellom TSO Comprehensive og HER2 DISH inkludert for HER2-genforsterkning

HER2-genforsterkning Alle (bryst og gastrisk)	HER2 DISH forsterket	HER2 DISH ikke forsterket
TSO Comprehensive (EU) Positiv	17 (inkludert 1 grensetilfelle)	13 (inkludert 1 grensetilfelle)
TSO Comprehensive (EU) Negativ	10 (inkludert 6 grensetilfeller)	68 (inkludert 12 grensetilfeller)
Prosentamsvar inkludert grensetilfeller	PPA: 63 % (17/27) 95 % CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % CI: [74 %, 90 %]
Prosentamsvar unntatt grensetilfeller	PPA: 80 % (16/20) 95 % CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % CI: [72 %, 90 %]

Deteksjon av mikrosatellittustabilitet

Deteksjonen av mikrosatellittustabilitet av TSO Comprehensive (EU)-analysen ble sammenlignet med resultatene fra en validert MSI-PCR-rest som bruker samsvarende prøver for tumor/normal til testing. Totalt 195 prøver, som oppfylte kravet til tumorinnhold på ≥ 30 % (for MS-Stable-status) og representerte 14 vevstyper, ble sammenlignet. MSI-PCR evaluerer 5 steder og har 3 utfall – MSS-Stable (ingen ustabile steder), MSI-Low (ett ustabil sted) og MSI-High (MSI-H) (to eller flere ustabile steder). TSO Comprehensive (EU) evaluerer opptil 130 mikrosatellittsteder og klassifiserer bare prøver som MS-Stable eller MSI-High (≥ 20 % ustabile steder). MSI-Low ble gruppert med MS-Stable-utfall for MSI-PCR. Konkordansanalyse vises i [Tabell 78](#).

Tabell 78 Sammenndrag av konkordansanalyse mellom TSO Comprehensive (EU) og MSI-PCR for DNA-mikrosatellittustabilitet

MSI-status	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI-Stable
TSO Comprehensive (EU) Ustabil (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabil (MS-Stable)	3	0	150
Totalt	44	2	150
Prosentamsvar	PPA: 93 % (41/44) 95 % CI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % CI: [95 %, > 99 %]	

Deteksjon av RNA-spleisevariant

Nøyaktighet for deteksjon av spleisevariant ble beregnet ved å sammenligne TSO Comprehensive (EU)-resultater med qPCR-analyser for EGFRvIII og Met Exon 14-skippping, som inkluderte én kjent positiv RNA for hver av spleisevariantene. Konkordansanalyse ble utført på totalt 230 unike FFPE RNA-prøver fra 14 vevstyper med tilgjengelige data av både TSO Comprehensive (EU)- og referansemetoden. Alle prøver ble testet for MET exon 14-skippping, mens EGFRvIII ble testet kun i henholdsvis hjernevev. Tre prøver ble betegnet som positive for MET exon 14-skippping ved qPCR, men ikke av TSO Comprehensive (EU) som hadde gjennomsnittlig Ct > 37 og var under TSO Comprehensive (EU) LoD-nivået. [Tabell 79](#) oppsummerer resultatene fra konkordansstudien.

Tabell 79 Sammenndrag av konkordansanalyse mellom TSO Comprehensive (EU)- og qPCR-analyse for RNA-spleisevarianter

RNA-spleisevarianter	qPCR-positiv	qPCR-negativ
TSO Comprehensive (EU) Positiv (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativ (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Positiv (Utelatelse av MET exon 14)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negativ (Utelatelse av MET exon 14)	3	217
Totalt	7	230
Prosentamsvar	PPA: 57 % (4/7) 95 % CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % CI: [98 %, 100 %]

Deteksjon av RNA-fusjon

Sammenligning med en sammensatt metode

TSO Comprehensive (EU)-fusjoner ble sammenlignet med en sammensatt metode bestående av sekvensering av hele RNA-eksomer ved hjelp av et NGS-panel (RNGS1), et målrettet NGS-fusjonspanel (RNGS2) og dråpedigital PCR (ddPCR).

RNGS1-metoden overlapper med alle genene som TSO Comprehensive (EU) kan detektere fusjoner for. Deteksjonsgrensen for RNGS1-metoden var imidlertid 4X–8X sammenlignet med TSO Comprehensive (EU) basert på antall støtteavlesninger som ble observert i de overlappende fusjonsbetegnelsene. Følgelig ble en sammensatt metode som benyttet to tilleggsmetoder med større sensitivitet, men mindre bredde for fusjoner, brukt sammen med WES (RNGS1)-metoden.

Totalt 255 unike RNA-prøver som representerte 14 vevstyper og besto TSO Comprehensive (EU)-måleverdier ble testet med RNGS1. To prøver var ugyldige for kvalitetskontroll av RNGS1 og ble utelatt fra tilleggsanalyse. Av de 82 fusjonene som ble betegnet av TSO Comprehensive (EU), ble 4 utelatt fra evaluering på grunn av ikke-bestått kvalitetskontroll av RNGS1, og 7 ytterligere fusjoner kunne ikke betegnes på grunn av fravær av målene i RNGS1-panelet. Av de resterende 71 fusjonene som ble betegnet av TSO Comprehensive (EU), bekreftet RNGS1 9 fusjoner. RNGS1 betegnet fire fusjoner som ikke ble betegnet av TSO Comprehensive (EU).

Fra de 62 fusjonene som var TSO Comprehensive (EU)-positive og ikke detektert av RNGS1, overlappet 13 med og ble bekreftet av RNGS2. Én fusjon ble betegnet av RNGS2, men ikke betegnet av TSO Comprehensive (EU).

Dråpedigital PCR ble brukt for fusjoner som ble betegnet av TSO Comprehensive (EU), som ikke ble betegnet eller ikke kunne betegnes av RNGS1, og som ikke kunne evalueres av RNGS2 (49). I tillegg ble ddPCR brukt for å evaluere to av de fire falskt negative fusjonene for TSO Comprehensive (EU) med RNGS1 og to av ni konkordante fusjoner for TSO Comprehensive (EU) og RNGS1 på nytt. Fem fusjonsnegative prøver ble inkludert med testing for hver positive fusjonsprøve for å sikre spesifisitet. Atten fusjoner ble ikke testet med ddPCR på grunn av manglende evne til å utforme primere/prober, flere genpartnere for fusjonen eller utilstrekkelig resterende FFPE-materiale. For ddPCR ble primere og prober utformet i forhold til de observerte bruddpunktene i TSO Comprehensive (EU)-analysen.

Totalt 52 fusjoner ble detektert med ddPCR, der 41 av disse ble betegnet av TSO Comprehensive (EU), men ble ikke betegnet eller ikke kunne betegnes av RNGS1. Ni fusjoner ble betegnet av ddPCR, men negative i TSO Comprehensive (EU) eller RNGS1. To ddPCR-positive fusjoner bekreftet de to konkordante fusjonene for TSO Comprehensive (EU) og RNGS1. Ingen fusjon ble detektert av ddPCR for de to falskt negative TSO Comprehensive (EU) som ble evaluert på nytt med RNGS1, men disse ble regnet som falskt negative basert på RNGS1-sammenligningen.

Av de 255 prøvene ble 35 prøver valgt for studien fordi de var fusjonspositive med TSO Comprehensive (EU) eller en forgjengeranalyse. Ytelsen til disse karakteriserte prøvene ble justert ved hjelp av en gjennomsnittlig fusjonsprevalens. Den kombinerte ytelsen på tvers av karakteriserte og ukarakteriserte prøver brukte et inversvariansvektet gjennomsnitt. De sammensatte konkordansresultatmetodene for fusjoner vises i [Tabell 80](#).

De 66 fusjonene (54 unike fusjoner) som samsvarte med den sammensatte metoden, representerte 43 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet. Fusjoner kan imidlertid rapporteres bare fra de 23 genene som er angitt i [Tabell 80](#).

Tabell 80 Sammendrag av samsvar for RNA-fusjoner

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

* Konfidensintervall beregnet av bootstrap.

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

Tjuefem NSCLC-prøver ble testet med FISH for henholdsvis både ROS1- og ALK-fusjoner, og 5 ekstra NSCLC-prøver ble testet for ROS1-fusjon. Åtte prøver besto ikke FISH for ROS1 på grunn av utilstrekkelig vev. To ROS1-fusjoner og én ALK-fusjon ble detektert av både TSO Comprehensive (EU) og FISH. Det ble ikke observert diskordante resultater. [Tabell 81](#) oppsummerer samsvarsresultatene for TSO Comprehensive (EU) og FISH-metoden for ROS1- og ALK-fusjoner.

Tabell 81 Sammendrag av samsvarsresultater for TSO Comprehensive (EU) og FISH-metoden for ROS1- og ALK-fusjoner

ALK+ROS1	FISH Positiv	FISH Negativ
TSO Comprehensive (EU) Positiv	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativ	0	44
Totalt	3	44
Prosentamsvar	PPA: 100 % (3/3) 95 % CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % CI: [92 %, 100 %]

Prøvegyldighet

Prøvegyldighet (første forsøk) ble målt for 181 unike RNA-prøver og 272 unike DNA-prøver fra FFPE-blokker ≤ 5 år. Disse prøvene ble valgt basert på vevstype og tilgjengelig materiale. Analysegyldighet var ukjent. Kvalitetskontrollmetrikken for bibliotek må bestå for varianttypen for å betraktes som gyldig. Prøvegyldighet ble evaluert separat for hver varianttype (små DNA-varianter/TMB, MSI, genforsterkninger, fusjoner/spleisevarianter) og vises i [Tabell 82](#). En ytterligere reduksjon i MSI-gyldighet på 1 % for FFPE-blokker ≤ 2 år på grunn av reagensforsendelse er anslått.

Tabell 82 Prøvegyldighet

Varianttype	Prøvegyldighet
Fusjoner/spleisevarianter (RNA)	76 %
Små DNA-varianter/TMB	75 %
MSI	72 %
Genforsterkning	94 %

Sammendrag av analytisk validering for tumorprofileringskrav

TSO Comprehensive (EU) valideres analytisk for følgende basert på deteksjonsgrense, presisjon, reproduserbarhet og nøyaktighetsdata:

- Små DNA-varianter – SNV-er, MNV-er, insersjoner og delesjoner
- TMB
- MSI
- Genforsterkninger for MET og ERBB2 (HER2) (se [Tabell 2](#)).
- 23 gener som fusjoner kan detekteres for (se [Tabell 2](#)).
- EGFR- og MET-spleisevarianter (se [Tabell 2](#)).

NTRK klinisk ytelse

For å validere TSO Comprehensive (EU)-analysen som en CDx for valg av pasienter for behandling med VITRAKVI (larotrectinib), ble prøver fra pasienter som er kvalifisert for kliniske studier av larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, samlet referert til som studieprøvene av larotrectinib) ved bruk av en dato for cutoff av data som var 15. juli 2019, supplert med kommersielt hentede FFPE-vevsprøver, testet for å støtte en nøyaktighetsstudie og klinisk mellomstudie for TSO Comprehensive (EU)-analysen.

NCT02122913 var en multisenter, åpen fase 1-doseeskaleringsstudie av voksne pasienter med fremskredne solide tumorer (gjelder alle), uten å selektere for NTRK-fusjonspositiv kreft. Etter doseeskaleringsdelen av studien ble det igangsatt en doseekspansjon for pasienter med dokumentert NTRK-fusjonspositiv kreft og for pasienter som undersøkeren mente kunne ha nytte av en svært selektiv TRK-hemmer. NAVIGATE NCT02576431 er en pågående, multisenter, åpen fase 2-samlestudie av pasienter i alderen 12 år og eldre med tilbakevendende, avanserte solide tumorer med en dokumentert NTRK-fusjon vurdert av et eksternt laboratorium. SCOUT NCT02637687 er en pågående, multisenter, åpen fase 1/2-studie av pediatriske pasienter i alderen fra fødsel til 21 år med fremskredne solide tumorer eller primærtumorer i sentralnervesystemet (CNS).

Av de NTRK-fusjonspositive pasientene som var med i studien av TSO Comprehensive (EU)-analysen, dannet 164 larotrectinib utvidet sett med primær effekt (ePAS4).

Nøyaktighetsstudie for deteksjon av NTRK1-, NTRK2- og NTRK3-fusjon

Nøyaktigheten til TSO Comprehensive (EU)-analysen for å detektere NTRK-fusjoner (NTRK1, NTRK2 eller NTRK3) hos pasienter med solide tumorer ble dokumentert ved å vurdere konkordansen til NTRK-fusjonsresultater mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og en validert ortogonal metode basert på neste generasjons sekvensering (NGS).

En retrospektiv, ikke-intervensjonell studie ble gjennomført. Studieprøver av larotrectinib og tilleggsprøver ble testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen ved 1 eksternt laboratorium og med en ortogonal metode ved et sentrallaboratorium. TSO Comprehensive (EU)-analysens nøyaktighet når det gjaldt betegnelsen av NTRK-fusjon ble estimert i forhold til den ortogonale metoden: positivt prosentsvare (PPA), negativt prosentsvare (NPA) og de tilhørende tosidige konfidensintervallene på 95 % (CI-er) ble beregnet.

516 prøver ble testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen og/eller den ortogonale metoden. Av disse ble 499 testet med begge metoder. Sytten av de 516 prøvene ble ikke testet med én av analysene fordi de ikke besto ekstraksjon, på grunn av ukjent årsak (for den ortogonale metoden) eller som følge av protokollavvik. Av de 499 prøvene som ble testet med begge metodene, var 170 (34,1 %) studieprøver av larotrectinib, og 329 (65,9 %) var tilleggsprøver.

En krysstabulering av resultater for de 499 prøvene vises i [Tabell 83](#). Av de 499 prøvene hadde 85 prøver ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater. Av disse hadde 85, 53 også ugyldige ortogonale metoderesultater. I tillegg hadde 7 prøver ugyldige resultater for ortogonal metode. Følgelig hadde 407 av de 499 prøvene gyldige resultater med begge metodene.

Tabell 83 NTRK-nøyaktighetsstudie: Krysstabulering av resultat for TSO Comprehensive (EU) kontra resultat for ortogonal metode i forbindelse med deteksjon av NTRK-fusjon

TSO Comprehensive (EU)-analyseresultat	Resultat for ortogonal metode			Totalt
	Positiv NTRK-fusjon	Negativ NTRK-fusjon	Ugyldig	
Positiv NTRK-fusjon	114	16	1	131
Negativ NTRK-fusjon	4	273	6	283
Ugyldige*	4	28	53	85
Totalt	122	317	60	499

* Ugyldige resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse kommer fra prøve og kjøringsnivå.

Samsvarsanalysene, unntatt og inkludert ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater, vises i [Tabell 84](#). Med unntak av ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater var PPA 96,6 % (114/118; 95 % CI: 91,5 % – 99,1 %) og NPA var 94,5 % (273/289; 95 % CI: 91,2 % – 96,8 %).

Tabell 84 NTRK-nøyaktighetsstudie: PPA og NPA for TSO Comprehensive (EU)-analysen sammenlignet med resultat for den ortogonale metoden for deteksjon av NTRK-fusjoner

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

* 95 % CI basert på (nøyaktig) Clopper-Pearson-metode.

Klinisk mellomstudie for deteksjon av NTRK1-, NTRK2- og NTRK3-fusjon

Den kliniske validiteten til TSO Comprehensive (EU)-analysen for deteksjon av NTRK1-, NTRK2- eller NTRK3-fusjoner hos pasienter med solide tumorer som kan ha nytte av behandling med larotrectinib, ble dokumentert i en klinisk mellomstudie. Studien ble gjennomført for å vurdere hvor klinisk effektiv TSO Comprehensive (EU)-analysen er til å identifisere NTRK1-, NTRK2- eller NTRK3-fusjonspositive pasienter for behandling med larotrectinib, og for å vurdere samsvaret mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og lokale testmetoder (LT) (som brukes til å fastslå NTRK-fusjonsstatus for de kliniske studiene av larotrectinib).

LT-metoder omfatter analyser med NGS, fluorescerende in situ-hybridisering (FISH), polymerasekjedereaksjon (PCR) og Nanostring. NTRK-fusjoner (ETV6 NTRK3) ble avledet for pasienter med infantilt fibrosarkom som hadde en dokumentert ETV6-translokasjon identifisert av FISH. De fleste av de 235 pasientene i studien av larotrectinib med kjent NTRK-fusjonsstatus, hadde blitt testet med NGS-metoder.

På datoen for cutoff av data, 15. juli 2019, var 279 pasienter kvalifisert. Av de 279 pasientene var 208 NTRK-fusjonspositive. Av de 208 positive pasientene dannet 164 larotrectinib ePAS4.

Det primære endepunktet for analysen av larotrectinib-effekt var samlet responsrate (ORR) i henhold til vurdering av en uavhengig granskingskomité (IRC) i et sammenslått datasett fra de tre kliniske studiene. ORR ble vurdert basert på andelen pasienter med best samlet respons av bekreftet fullstendig respons eller bekreftet delvis respons basert på kriteriene i RECIST, versjon 1.1. ORR i larotrectinib ePAS4 var 72,6 % (95 % CI [65,1 %, 79,2 %]), og omfattet pasienter med 16 forskjellige tumortyper.

Prøveredegjørelse

Prøvesettet omfattet representasjon av et bredt spekter av tumortyper og prøver fra pediatriske og voksne pasienter.

279 pasienter var kvalifisert for studiene av larotrectinib den 15. juli 2019. Av disse hadde 235 pasienter kjent NTRK-fusjonsstatus som ble fastslått med en LT-metode: 208 var positive og 27 var negative. For 44 pasienter var NTRK-fusjonsstatusen ukjent, ettersom testing ikke var nødvendig for at pasientene skulle være valgbare i doseeskalasjonsfasene i NCT02122913- og SCOUT NCT02637687-studiene. For den kliniske mellomstudien av

TSO Comprehensive (EU)-analysen var prøver fra pasienter i studien av larotrectinib som var kvalifisert 15. juli 2019 med kjent NTRK fusjonsstatus (208 positive pasienter og 27 negative pasienter) og tilleggsprøvene som var fastslått å være NTRK-fusjonsnegative med representative LT-metoder, valgbare for denne studien.

Av de 208 positive studieprøvene av larotrectinib, hadde 154 en prøve tilgjengelig for testing av TSO Comprehensive (EU)-analysen. Av disse hadde 138 gyldige resultater. Femten prøver var ugyldige fordi kvalitetsmetrikk for prøvesekvensering ikke besto, og 1 prøve ble ikke testet på grunn av et protokollavvik. Av de 27 negative studieprøvene av larotrectinib, hadde 24 en prøve tilgjengelig for testing. Av disse hadde 22 gyldige TSO Comprehensive (EU)-resultater. To prøver var ugyldige fordi kvalitetsmetrikk for prøvesekvensering ikke besto.

Tilleggsprøver ble undersøkt ved å bruke én av to representative LT-metoder. Mer enn 350 prøver ble fremskaffet og undersøkt med tanke på tumorinnhold. Av tilleggsprøvene som oppfylte prøvekravene ble 266 ekstrahert og bekreftet å være NTRK-fusjonsnegative med en representativ LT-metode. Av disse var 260 tilgjengelige for testing av TSO Comprehensive (EU)-analyse, hvorav 222 hadde gyldige resultater. Det var 38 prøver som var ugyldige fordi de ikke besto prøvesekvenseringsmetrikken (n = 25) eller ikke besto kjøringssekvensering (n = 13). Det samlede NTRK-fusjonsnegative settet besto av 222 tilleggprøver og 22 studieprøver av larotrectinib.

Konkordansresultater

Totalt var det 437 prøver testet av TSO Comprehensive (EU). Blant de 208 NTRK-fusjonspositive pasientene var det 153 som hadde tilgjengelige prøver og ble testet med TSO Comprehensive (EU), noe som ga 138 gyldige resultater og 15 ugyldige resultater.

Samsvar mellom resultater for TSO Comprehensive (EU) i forhold til resultater for LT-metoder, med eller uten gyldige resultater for TSO Comprehensive (EU), vises i [Tabell 85](#).

Tabell 85 NTRK klinisk overgangsstudie: Samsvar mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metodene for deteksjon av NTRK-fusjoner

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

* De tosidige 95 % CI-ene ble beregnet ved å bruke (den nøyaktige) Clopper-Pearson-metoden.

Analyse av sensitivitet mot de manglende resultatene for TSO Comprehensive (EU)-analyse viste robustheten til samsvaranalysen. Manglende resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse for de LT NTRK-fusjonspositive pasientene (n = 70) ble imputert ved bruk av en logisk regresjonsmodell. Samsvarsestimater, inkludert de imputerte verdiene, vises i [Tabell 86](#).

Tabell 86 NTRK klinisk overgangsstudie: Konkordans mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metodene for deteksjon av NTRK-fusjoner, inkludert imputerte verdier for LT-positive pasienter med manglende resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse

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

Manglende resultater for TSO Comprehensive-analyse (EU) for LT-fusjonsnegative pasienter ble ikke imputert.

* De tosidige 95 % CI-ene ble beregnet basert på Boot-metoden med flere imputasjoner. Boot-metoden med flere imputasjoner er et primærinnlastingstrinn som er nestet i imputasjonen av flere (Schomaker and Heumann 2018).

Samsvar mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-ene etter metodetype (f.eks. RNA NGS, FISH) vises i [Tabell 87](#).

Tabell 87 NTRK klinisk overgangsstudie: Samsvar mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metodene for deteksjon av NTRK-fusjoner etter LT-metodetype

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

Ikke beregnet: For undergrupper med prøveantall < 5 ble det ikke beregnet samsvarsstatistikk.

¹ De tosidige 95 % CI-ene ble beregnet ved å bruke (den nøyaktige) Clopper-Pearson-metoden.

² Omfatter NGS-metoder som bare bruker RNA og både DNA og RNA.

Av de 437 prøvene som ble testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen, hadde 24 diskordante resultater med LT-ene: 15 var positive med LT-ene og negative med TSO Comprehensive (EU)-analysen, og 9 var negative med LT-ene og positive med TSO Comprehensive (EU)-analysen. Av de 24 prøvene med diskordante resultater, ble 8 testet med en DNA NGS LT-metode, 14 med en RNA NGS LT-metode og 2 med FISH.

En validert, uavhengig NGS-metode bekreftet resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse i 14 av de 24 prøvene med diskordante resultater. Når det gjelder de resterende 10 prøvene, var resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse diskordante med både LT- og den uavhengige NGS-metoden.

Resultater for klinisk effektivitet

Innen ePAS4-kohorten var effektiviteten til larotrectinib hos den TSO Comprehensive (EU)-positive, LT-positive populasjonen (97 pasienter, ORR=78,4 %, 95 % CI [68,8 %, 86,1 %]) lignende effektiviteten til larotrectinib i den samlede ePAS4-populasjonen (164 pasienter, ORR=72,6 %, 95 % CI [65,1 %, 79,2 %]) (Tabell 88). Av de 97 TSO Comprehensive (EU)-positive pasientene i ePAS4, hadde 28 (28,9 %) pasienter oppnådd en fullstendig respons / kirurgisk fullstendig respons, og 48 (49,5 %) pasienter hadde oppnådd en delvis respons.

I populasjonen med 13 TSO Comprehensive (EU)-negative, LT-positive pasienter, viste 1 (7,7 %) fullstendig respons og 2 (15,4 %) delvis respons på behandling med larotrectinib.

Tabell 88 NTRK klinisk overgangsstudie: ORR for LT-positive pasienter etter LT og TSO Comprehensive (EU)-resultater i ePAS4

		LT Fusion Positiv N=164	TSO Comprehensive (EU) Positiv og LT-positiv N=97	TSO Comprehensive (EU) Negativ og LT- positiv N=13
Beste samlede respons, n (%)	Fullstendig respons	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Kirurgisk fullstendig respons	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Delvis respons	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabil sykdom	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progressiv sykdom	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Ikke mulig å evaluere	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Samlet responsrate	Antall pasienter, n	164	97	13
	Antall pasienter med CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR i % (95 % CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

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

Det tosidige 95 % konfidensintervallet ble beregnet ved å bruke (den nøyaktige) Clopper-Pearson-metoden.

54 pasienter mangler resultater for TSO Comprehensive-analyse (EU).

Dataene fra denne studien støtter sikkerheten og effektiviteten til TSO Comprehensive (EU)-analysen når den brukes til å identifisere pasienter med solide tumorer med NTRK-fusjoner som kan være kvalifisert for behandling med larotrectinib.

Referanser

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

Revisjonshistorikk

Revisjon	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200007789 v08	Mai 2025	<p>Fjernet referanse til programvareversjoner og delenumre.</p> <p>Oppdatert prosedyremessige begrensninger:</p> <ul style="list-style-type: none">• Informasjon om nekrotisk vev.• Informasjon om MSI-tumorinnhold. <p>Oppdatert:</p> <ul style="list-style-type: none">• NTC-fotnoten skal gjelde både for min.- og maks.-biblioteker.• Utstyr og materialer lister opp sentrifugespesifikasjoner for plate og pipettetrinn.• Beregning av SPB-overskudd fra 1,05x til 1,15x.• Terminologi for MET-ekson 14 del til MET-ekson 14 hopper over. <p>Lagt til:</p> <ul style="list-style-type: none">• Merknad for SMB i Innhentingsmål én og to.• Klargjør for introduksjon av sekvensering.• Ytterligere ultralydinformasjon. <p>Lagt til avklaringer og oppdaterte resultater for ytelsesegenskaper:</p> <ul style="list-style-type: none">• Forstyrrende stoffer.• Nøyaktighet for tumorprofilering og prøvegyldighet.• Deteksjonsgrense studie 1 og 2.• Presisjon innen laboratoriet studie 1.• Reproduserbarhetsstudie 2.• Bibliotekstabilitet og informasjon om biblioteklagring.• Grense for blank. <p>Oppdatert språk og grammatikk.</p>

Revisjon	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200007789 v07	Januar 2024	<ul style="list-style-type: none"> • Lagt til informasjon om prosedyrebegrensninger: <ul style="list-style-type: none"> • Prøvekrav for nekrotisk vev og tumorinnhold for MSI-høye og somatiske drivermutasjoner. • Potensiell interferens fra hemoglobin. • Deteksjonsgrenser i RET-genet og fusjonsbetegnelse utenfor annoterte gengrenser. • Genslettinger rapporteres ikke. • Oppdatert for bruk med TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager-programvareversjon 2.3.7. • Lagt til informasjon til det nødvendige, men ikke leverte utstyr og materialer, inkludert to ekstra ultralydkonfigurasjoner. • Oppdatert informasjon om prøve og spesimen: <ul style="list-style-type: none"> • Nekrotisk vevinnhold. • Effekter av proteinase K og hemoglobin. • Oppbevaring av objektglassmontert FFPE- og rensset nukleinsyre. • Lagt til informasjon for å forbedre reagenshåndteringen, arbeidsflyten og feilsøkingen av kvalitetskontrollfeil for kjøring. • Lagt til kontekst og klarhet i ytelsesegenskaper: <ul style="list-style-type: none"> • Krysskontaminasjon • Evaluering av ekstraksjonssett for nukleinsyre • Forstyrrende stoffer • Nukleinsyre og objektglassmontert FFPE-stabilitet • NTRK klinisk ytelse • Oppdatert språk og grammatikk
Dokumentnr. 200007789 v06	Februar 2023	<ul style="list-style-type: none"> • Ytterligere uttalelser i avsnittet Begrensninger • Språkoppdateringer for konvensjoner, grammatikk og klarhet • Korrigering av tabell 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Erklæring om tilstedeværelse av utfelling i FSM-reagens • Oppdaterte spesifikasjoner for termosykler og kar i listen Utstyr og materialer
Dokumentnr. 200007789 v05	September 2022	Oppdatert reproducerbarhetstabeller for studie 2
Dokumentnr. 200007789 v04	Juni 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Lagt til TSO Comprehensive Analysis Module v2.3.5 PN-er • Fjernet TSO Comprehensive Analysis Module v2.3.3 PN-er • Oppdatert terminologi i delen Grense for blank

Revisjon	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200007789 v03	April 2022	<ul style="list-style-type: none">• La til informasjon om ytelseskarakteristikk knyttet til NTRK-fusjoner• La til merkingen KUN FOR EKSPORT• Oppdaterte erklæringen om tiltenkt bruk for å legge til NTRK1-3 CDx-kravet• Utvidet informasjon om produktkomponenter slik at PN-er er med for programvarekomponenter
Dokumentnr. 200007789 v02	Februar 2022	<ul style="list-style-type: none">• Rettet opp tabellreferansefeil• Satt inn begrensning knyttet til kimbane og somatiske varianter• Presisert ordlyd rundt påvisning av genforsterkning
Dokumentnr. 200007789 v01	Desember 2021	<ul style="list-style-type: none">• Oppdaterte prosedyremessige begrensninger• Avklarte spesifikasjonene for magnetstativet og termosykler i listene over utstyr og materialer
Dokumentnr. 200007789 v00	November 2021	Første versjon

Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og dets tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktene beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges nøyaktig og kun av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktene som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktene brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKkelig FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTENE, SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTENE.

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTENE SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2025 Illumina, Inc. Alle rettigheter forbeholdt.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. For spesifikk informasjon om varemerker, se www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformasjon



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



Produktmerking

Ønsker du en fullstendig oversikt over symYESboler som finnes på produktemballasjen og -merkingen, kan du gå til support.illumina.com og lese under fanen *Documentation* (Dokumentasjon) for settet.