

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK
KUN TIL EKSPORT

Tilsigtet brug

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

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

Tabel 1 Indikation af ledsagende diagnosticering

Tumor Type (Tumortype)	Biomarkers (Biomarkører)	Targeted Theray (Målrettet behandling)
Solid Tumors (Solide tumorer)	NTRK1, NTRK2 og NTRK3 Genfusioner	VITRAKVI® (larotrectinib)

Resumé og forklaring af analysen

Klinisk beskrivelse

Kræft er en førende dødsårsag på verdensplan og har potentiale for at kunne dannes i enhver form for væv.¹ Analyse af en tumors genetiske grundlag er vigtig for at identificere patienter, der kan have gavn af målrettede behandlinger, og for udvikling af nye behandlingsmetoder. Adskillige gener har været involveret i årsager til og progression af tumor, og mange tumorer bærer en række variationer, der påvirker disse gener og deres funktioner. Disse variationer kan omfatte genmutationer, såsom enkeltnukleotidvariationer (SNV'er), multinukleotidvariationer (MNV'er), insertioner eller deletioner, genamplifikationer, genfusioner og splejsningsvariationer. En anden konsekvens ved tumorgenmutationer er præsentation af neoantigener, der udløser tumorspecifikke immunreaktioner. En tumors mutationsstatus kan være repræsenteret ved TMB og MSI, som er genomiske signaturer tilknyttet præsentation af neoantigener i tumorer.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) er en næste generations sekventeringstest (NGS) til omfattende genomprofilerings, der bredt vurderer genomiske variationer i et stort panel af cancerrelaterede gener anført i [Tabel 2](#). Analysen detekterer små variationer i 517 gener plus genamplifikationer, fusioner og splejningsvariationer som indikeret i [Tabel 2](#). Analysen giver kodningssekvensdækning for alle gener bortset fra TERT, hvor kun promoterregionen dækkes. Analysen evaluerer også TMB-score og status for MSI. Disse analysemaal inkluderer indhold citeret af professionelle organisationer såsom European Society for Medical Oncology (ESMO) og andre store amerikanske retningslinjer.² Uafhængige konsortiepublikationer og lægemiddelforskning på sene stadier påvirkede også designet af TSO Comprehensive-analysen.

Få en liste over regioner, som er udelukket fra variationsbestemmelse ved at se i filen *TruSight Oncology Comprehensive Block List (dokumentnr. 200009524)*, der findes på Illumina-supportwebstedet. Bloklisten bliver i visse filer omtalt som sortlisten.

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

Tabel 2 TSO Comprehensive (EU)-analysegenpanel

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTB	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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S

Indlæggsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Variationstype
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT	IKKE RELEVANT

Procedureprincipper

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

TSO Comprehensive (EU)-analysen involverer fire vigtige processer.

- **Berigelse og klargøring af bibliotek** – 40 ng samlet RNA omdannes til dobbeltstrenget komplementær DNA (cDNA). 40 ng genomisk DNA (gDNA) skæres til små fragmenter. Universelle adaptore til sekventering liggeres på cDNA'et og gDNA-fragmenterne. P5- og P7-indekssekvenser inkorporeres i hvert bibliotek for at muliggøre indfangning af biblioteksfragmenter på overfladen af flowcellen under sekventering. Indsekserne inkluderer en unik sekvens til at identificere hver individuelle prøve og, i tilfælde af biblioteker fra gDNA-prøver, individuelle molekyler ved hjælp af unikke molekulære identifikatorer (UMI'er). Herefter beriges bibliotekerne for de specifikke gener af interesse baseret på en indfangningsmetode. Biotinylerede probesekvenser, der spænder over genregionerne af interesse, som analysen er målrettet mod, hybridiseres til bibliotekerne. Proberne og de hybridiserede, målrettede biblioteker isoleres fra ikke-målrettede biblioteker ved indfangning med streptavidin magnetiske perler. De målrettede, berigede biblioteker vaskes og amplificeres. Kvantiteten af hvert berigede bibliotek normaliseres herefter ved hjælp af en perlebaseret metode for at sikre en ligelig fordeling af de samlede biblioteker til sekventering.
- **Sekventering og primær analyse** – Normaliserede, berigede biblioteker samles og pooles sammen på en flowcelle og sekventeres ved hjælp af sekventering ved syntesekemi (SBS) på NextSeq 550Dx. SBS-kemi anvender en reversibel terminator-metode til at detektere enkelt, fluorescensmærkede deoxynukleotidtriphosphatbaser (dNTP), når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Under hver sekventeringscyklus tilføjes en enkelt dNTP til nukleinsyrekæden. dNTP-mærkatene fungerer som en terminator for polymerisering. Efter hver inkorporering af dNTP bruges det fluorescerende farvestof til at identificere basen og spaltes herefter for at muliggøre inkorporering af det næste nukleotid. Fire reversible, terminator-bundne dNTP'er (A, G, T og C) er til stede som enkelte, separate molekyler. Som et resultat minimerer naturlig konkurrence inkorporeringsbias. Under den primære analyse foretages basebestemmelser direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekventeringscyklus, hvilket resulterer i base-for-base-sekventering. Der tildeles en kvalitetsscore til hver basebestemmelse.
- **Sekundær analyse** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive-analysemodulet er integreret i NextSeq 550Dx-instrumentet som en del af Local Run Manager-softwaren for at lette TSO Comprehensive (EU)-kørselskonfigurationen og foretage den sekundære analyse af sekventeringsresultaterne. Sekundær analyse omfatter validering af kørslen og kvalitetskontrol, efterfulgt af demultiplexing, generering af FASTQ-fil, alignment og variationsbestemmelse. Demultiplexing adskiller data fra samlede biblioteker baseret på de unikke sekvensindekser, der blev tilføjet under proceduren til klargøring af bibliotek. Midlertidige FASTQ-filer genereres, der indeholder sekventeringslæsninger for hver prøve samt kvalitetsresultater, hvor læsninger fra alle clustre, der ikke passeret filteret, udelukkes. Sekventeringslæsningerne tilpasses herefter imod et referencegenom for at identificere en relation mellem sekvenserne og tildeles en score baseret på områder med lighedspunkter. Tilpassede læsninger skrives til filer i BAM-format. Analysesoftwaren anvender separate algoritmer til biblioteker genereret fra DNA-

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

og/eller RNA-prøver til at bestemme små DNA-varianter, genamplifikationer, TMB og MSI for DNA-prøver og fusioner og splejningsvarianter for RNA-prøver. Analysesoftwaremodulet genererer flere output, herunder sekventeringsmålinger og variationsbestemmelsesfiler (VCF). VCF-filer indeholder oplysninger om varianter fundet ved specifikke positioner i et referencegenom. Sekventeringsmålinger og individuelle output-filer genereres for hver prøve.

- **Tertiær analyse** – Tertiær analyse, der udføres af Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodulet, består af TMB- og MSI-beregninger, ledsagende diagnostikbestemmelser, tumorprofilerings af varianter i to niveauer af klinisk signifikans ved hjælp af en vidensbase (KB) og vævstypen og generering af en rapport over resultaterne. Tumorprofilerings kan også henvises til som omfattende genomprofilerings. De fortolkede resultater for variation, samt resultater for TMB- og MSI-biomarkører, er opsummeret i rapporten TSO Comprehensive (EU)-resultater.

Procedurens begrænsninger

Kun til *in vitro* diagnostisk brug.

- Må kun anvendes på ordination. Testen skal anvendes i overensstemmelse med forordninger for kliniske laboratorier.
- Listen over genomfund i [Tabel 2](#) over tilsigtet brug er ikke foreskrevet eller endegyldig til målrettet brug af et specifikt terapeutisk produkt.
- Der er ikke foretaget klinisk validering af varianter, der er anført på listen over resultater i TSO Comprehensive (EU)-rapporten under Genomfund med evidens for klinisk signifikans og Genomfund med potentiel klinisk signifikans.
- Beslutninger vedrørende patientpleje og behandling skal være baseret på den behandlende læges uafhængige, medicinske vurdering under hensyntagen til alle gældende oplysninger om patientens forhold og familiehistorik, fysiske undersøgelser, oplysninger fra andre diagnostiske test og patientpræferencer i overensstemmelse med standarden for pleje i et givent samfund.
- Kvaliteten af FFPE-prøven varierer meget. Prøver, der ikke har undergået standardprocedurer for fiksering, genererer muligvis ikke ekstraherede nukleinsyrer, der opfylder kravene til analysens kvalitetskontrol ([Kvalitetskontrol på side 78](#)). FFPE-blokke, der har været opbevaret i mere end fem år, har udvist lavere validitet.
- Ydeevnen for TSO Comprehensive (EU) i prøver, der stammer fra patienter, der har fået foretaget organ- eller vævstransplantation, er ikke blevet evalueret.
- I højt omarrangerede genomer med deletioner og tab af heterozygositet kan TSO Comprehensive (EU)-softwaren fejlagtigt klassificere en DNA-prøve som kontamineret (KONTAMINERINGSSCORE > 3106 og p-værdi > 0,049).
- Et negativt resultat udelukker ikke tilstedeværelsen af en mutation, der er under analysens detektionsgrænse (LoD).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- Følsomheden af detektering af små DNA-varianter kan være påvirket af:
 - Genomisk kontekst med lav kompleksitet
 - Stigende variationslængde
- I de følgende sammenhænge kan TMB-scorer være unøjagtige:
 - Hvis tumorindholdet når niveauer, hvor kimcelle- og somatisk variationsallelfrekvenser (VAF'er) konvergerer.
 - Hos populationer, der ikke er godt repræsenteret i offentlige databaser.
- Følsomheden af detektering af fusioner kan være påvirket af:
 - Lav bibliotekskompleksitet, hvilket medfører en reduktion i understøttende læsninger som følge af afvigelser i analysens arbejdsgang (f.eks. efter blandingstrinnene i [Denaturering og annealing af RNA på side 43](#)).
 - Når et enkelt gen omfatter begge brudpunkter.
 - I tilfælde, hvor flere brudpunkter for fusioner er tæt på hinanden med én eller flere partnere, rapporteres flere brudpunkter og partnere muligvis som et enkelt brudpunkt og en enkelt partner.
 - Ved små median insert størrelser kræves en minimum median insert størrelse på 80 bp, men følsomheden falder i intervallet 80-100 bp.
 - Ved lav sekvenskompleksitet eller homologt genomisk indhold omkring fusionsbrudpunkter.
- Opløsning af gener i en fusion kan blive påvirket, når fusionsbrudpunkter opstår i genomiske regioner, der indeholder overlappende gener. Analysen rapporterer alle gener adskilt af semikolon, hvis flere gener overlapper et brudpunkt.
- Inkonsekvent dækning i TERT-promotorregionen kan medføre No Result (Intet resultat) på grund af lav dybde.
- Annotationsfejl eller fejl i videnbasen kan medføre et falsk positivt eller falsk negativt resultat, herunder at en variation anføres på det forkerte niveau (mellem Genomfund med evidens for klinisk signifikans og Genomfund med potentiel klinisk signifikans), eller annotationsoplysningerne i rapporten kan være forkerte. Muligheden for fejl kan opstå fra tre kilder:
 - TSO Comprehensive (EU)-annotering af variationer. Der er en fejlrate på ca. 0,0027 % baseret på en analyse af 2.448.350 variationer fra COSMIC v92, og muligheden for fejl er derfor lav.
 - Fejl i videnbase som følge af processen til organisering eller inddeling i niveauer.
 - Relevansen af videnbasens indhold ændrer sig over tid. Denne rapport afspejler den tilgængelige viden på det tidspunkt, hvor videnbasen blev organiseret.
 - Ingen variationer i ledsagende diagnostikresultater blev påvirket af enten annotering eller videnbasefejl.
- TSO Comprehensive (EU) er designet til at rapportere somatiske variationer ved rapportering af variationer med evidens for klinisk signifikans eller variationer med potentiel klinisk signifikans. Som en test udelukkende med tumor er rapportering af kimcellevariation (nedarvet) mulig, men utilsigtet. TSO Comprehensive (EU) bruger en videnbase til at rapportere variationer uden eksplicit at annotere, om de er af kimcelleoprindelse eller af somatisk oprindelse.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- Videnbasen omfatter udelukkende terapeutiske, diagnostiske og prognostiske tilknytninger, der er relevante for variationer, som er til stede i en etableret tumor. Følsomheds- eller cancerrisikotilknytninger er ikke inkluderet i videnbasen.

Produktets bestanddele

TruSight Oncology Comprehensive (EU)-testen består af de følgende komponenter:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU)-kit (Illumina katalognr. 20063092) — Sættet indeholder reagenser med tilstrækkeligt volumen til at generere 48 biblioteker (24 DNA-biblioteker og 24 RNA-biblioteker). Reagensvolumen omfatter også kontroller.
- Videnbase — Opdateres månedligt og kan downloades fra Illumina Lighthouse Portal.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodulet – En Illumina-servicerepræsentant installerer en af følgende versioner på NextSeq 550Dx-instrumentet:
 - Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodulet (Illumina-katalognr. 20051843), som omfatter følgende komponenter og understøtter tumorprofilering og NTRK:
 - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.1.0 (PN 20079589)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 Software Suite (PN 20079588)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 USB Kit (PN 20079591)
 - Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodulet (Illumina-katalognr. 20051843), som omfatter følgende komponenter og understøtter tumorprofilering og NTRK:
 - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (PN 20051760)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 Software Suite (PN 20075244)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 USB Kit (PN 20075239)

Reagenser

Medfølgende reagenser

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

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

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), PN 20031118

Reagens	Delnummer	Antal	Volumen	Aktive stoffer	Opbevarings-temperatur
End repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder T4 DNA-polymerase og polynukleotidkinase.	-25 °C til -15 °C
End repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og nukleotider.	-25 °C til -15 °C
Adapter-ligeringsbuffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte.	-25 °C til -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder ligase.	-25 °C til -15 °C

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Reagens	Delnummer	Antal	Volumen	Aktive stoffer	Opbevarings-temperatur
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder universelle oligonukleotider til sekventering.	-25 °C til -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder universelle oligonukleotider til sekventering.	-25 °C til -15 °C
Stop-ligeringsbuffer (STL)	20031440	2	480 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte.	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder DNA-polymerase og nukleotider.	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), PN 20031119

Reagens	Delnummer	Antal	Volumen	Aktive stoffer	Opbevarings-temperatur
Resuspensionsbuffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte.	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler.	2 °C til 8 °C
TE Buffer (TEB)	20031443	1	10 ml	Tris EDTA-opløsning.	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

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

Bemærk! Brug unikke indeksprimere (UPxx) til RNA- eller DNA- prøver.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Indeks- primer	Delnummer	Antal	Volumen	i7- indeks	i7- sekvens	i5- indeks	i5- sekvens	Opbevarings- temperatur
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 stoffer: Bufret vandig opløsning indeholdende oligonukleotidprimere forsynet med individuel stregkode.



FORSIGTIG

Brug kun kombinatoriske indeksprimere (CPxx) til DNA- prøver (FFPE-arbejdsgang)

Indeks- primer	Del- nummer	Antal	Volumen	i7- indeks	Sek- ventering	i5- indeks	Sek- ventering	Opbevarings- temperatur
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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Indeks- primer	Del- nummer	Antal	Volumen	i7- indeks	Sek- ventering	i5- indeks	Sek- ventering	Opbevarings- temperatur
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), PN 20031123

Reagens	Delnummer	Antal	Volumen	Aktive stoffer	Opbevarings- temperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder formamid og salte	2 °C til 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og fast fase-magnetiske perler kovalent coatet med streptavidin	2 °C til 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxidopløsning	2 °C til 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder fast fase-paramagnetiske perler	2 °C til 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte, 2-mercaptoethanol og formamid	2 °C til 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Resuspensionsbuffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2° C til 8°C

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Reagens	Delnummer	Antal	Volumen	Aktive stoffer	Opbevarings-temperatur
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), PN 20031121

Reagens	Delnummer	Antal	Volumen	Aktive stoffer	Opbevarings-temperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder oligonukleotider	-25 °C til -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder rensmiddel	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder P5- og P7-primere	-25 °C til -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte, 2-mercaptoethanol og formamid	-25 °C til -15 °C
PhiX Internal Control (PhiX)	20031492	1	10 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder PhiX genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

TruSight Oncology Comp Indhold i kittet, PN 20031122

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

Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

Reagenser præ-amplifikation

- Reagenser til ekstraktion og oprensning af DNA og RNA – Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23](#) for krav til reagenser.
- Reagenser til kvantificering af DNA og RNA – Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23](#) for krav til reagenser.
- TruSight Oncology DNA Control (Illumina katalognummer 20065041)
- TruSight Oncology RNA Control (Illumina katalognummer 20065042)
- Ethanol, 100 % (200 proof) til molekylærbiologi
- RNase/DNase-frit vand

Reagenser post amplifikation

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklusser) (Illumina katalognr. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklusser)
- Ethanol, 100 % (200 proof) til molekylærbiologi
- RNase/DNase-frit vand

Opbevaring og håndtering af reagens

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

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



FORSIGTIG

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

- Følgende reagenskasser sendes på gelpakker for at bevare 0 °C til 10 °C. Opbevares ved 2 °C til 8 °C.

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



FORSIGTIG

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

- Ændringer i reagensernes udseende kan være tegn på nedbrydning af materialerne. Reagenserne må ikke anvendes, hvis de ændrer udseende (f.eks. farveændring eller uklarhed).
- Stabiliteten af TSO Comprehensive (EU)-analysen er blevet evalueret og ydelse påvist for op til fire anvendelser af kittet. Ved opbevaring ved de indikerede temperaturer er reagenserne stabile indtil den udløbsdato, der er anført på æskens mærkat.

Udstyr og materialer

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, medfølger ikke

Udstyr og materialer præ-amplifikation

Udstyr	Leverandør
Ultrasonikator med tilknyttet ekstraudstyr Se Optimering af ultrasonikatorer til fragmentering af DNA på side 21 .	Almen laboratorieleverandør
Termocykler med følgende specifikationer: - Opvarmet låg, der kan indstilles til 30 °C og 100 °C (eller slukket, hvis det ikke kan opvarmes til 30 °C) - Temperaturinterval på 4 °C til 100 °C - Temperaturpræcision: ± 0,25 °C - Kompatibel med 96-brønds PCR-plader, 0,2 ml (polypropylen)	Almen laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubatorer (2) med indsatser til 96-brønds MIDI-plader (2)	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
Centrifuger (ved hjælp af pladecentrifuge) med følgende kapaciteter: - Centrifugering af 96-brønds mikropalader - Kapacitet til 280 x g	Almen laboratorieleverandør
Pladeomryster med følgende kapaciteter: 2 mm orbital radius - Kan omryste ved 1200 og 1800 o/min.	Almen laboratorieleverandør
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk holder med følgende specifikationer: - Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation - Magneter på siden af holderen, ikke i bunden - Til 96-brønds MIDI-plader	Almen laboratorieleverandør
Præcisionspipetter 20 µl enkelt- eller multikanalpipette 200 µl enkelt- eller multikanalpipette 1000 µl enkelt- eller multikanalpipette Der opfylder følgende krav: - Kalibreret regelmæssigt, inden for en nøjagtighed på 5 %.	Almen laboratorieleverandør

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Udstyr	Leverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: • Optisk klar polyester, der kan pilles af • Passer til PCR- plader med skørt eller halvskørt • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -40 °C til 110 °C • DNase/RNase-frit	Almen laboratorieleverandør
1,7 ml mikrocentrifugerør, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefri reagensreservoirer (PVC, skål til engangsbrug, 50 ml)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
20 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
200 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
1000 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønds PCR-plader, 0,2 ml (polypropylen)	Almen laboratorieleverandør

Udstyr og materialer post amplifikation

Udstyr	Leverandør
NextSeq 550Dx-instrument	Illumina, katalognr. 20005715
Centrifuger (ved hjælp af pladecentrifuge) med følgende kapaciteter: • Centrifugering af 96-brønds mikroplader • Kapacitet til 280 x g	Almen laboratorieleverandør
Termocykler med følgende specifikationer: • Opvarmet låg (100 °C) • Temperaturinterval på 4 °C til 100 °C • Temperaturpræcision: ± 0,25 °C • Kompatibel med 96-brønds PCR-plader, 0,2 ml (polypropylen)	Almen laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator med indsats til 96-brønds MIDI-plader	Almen laboratorieleverandør

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Udstyr	Leverandør
Tør varmeblok med følgende specifikationer: • Temperaturinterval på 25 °C til 99 °C • Temperaturpræcision: ± 5 °C	Almen laboratorieleverandør
Pladeomryster med følgende kapaciteter: • 2 mm orbital radius • Kan omryste ved 1200 og 1800 o/min.	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk holder med følgende specifikationer: • Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation • Magneter på siden af holderen, ikke i bunden • Til 96-brønds MIDI-plader	Almen laboratorieleverandør
Præcisionspipetter • 20 µl enkelt- eller multikanalpipette • 200 µl enkelt- eller multikanalpipette • 1000 µl enkelt- eller multikanalpipette Der opfylder følgende krav: • Kalibreret regelmæssigt, inden for en nøjagtighed på 5 %.	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: • Optisk klar polyester, der kan pilles af • Passer til PCR- plader med skørt eller halvskørt • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -40 °C til 110 °C • DNase/RNase-frit	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefri reagensreservoirer (PVC, skål til engangsbrug, 50 ml)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
20 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
200 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
1000 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønds PCR-plader, 0,2 ml (polypropylen)	Almen laboratorieleverandør

Optimering af ultrasonikatorer til fragmentering af DNA

DNA-fragmentering eller -afklipning har indflydelse på analysens ydeevne ved bestemmelse af fordeling af fragmentstørrelse, der til gengæld påvirker sekventeringsdækningen. Flere konfigurationer målrettet mod ultrasonikering blev evalueret og optimeret for TSO Comprehensive (EU)-analysen ([Tabel 3](#)). Afklipningstiden blev justeret for at maksimere målingen MEDIAN_EXON_COVERAGE (MEDIAN_EXONDÆKNING) beskrevet i afsnittet Kvalitetskontrol. Afklipningstiden (markeret med fed i [Tabel 3](#)) afveg på tværs af konfiguration, og det samme gjorde resultaterne for MEDIAN_INSERT_SIZE (MEDIAN_INSERT_STØRRELSE). Alle 3 konfigurationer blev testet med rør med 8 strimler. De anvendte volumener er vist i [Tabel 3](#).

Optimering af konfiguration 3 (punkttransducer, ikke-afgasset vand, vandbad med lille volumen) anvendte pulsering og havde den korteste afklipningstid, hvilket resulterede i en lidt større fordeling af fragmentstørrelse sammenlignet med de to andre konfigurationer (MEDIAN_INSERT_SIZE (MEDIAN_INSERT_STØRRELSE) var ca. 5-10 basepar større). Derudover krævede konfiguration 3 et øget DNA-input (50 ng) for at opnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE (MEDIAN_EXONDÆKNING) i forhold til de 2 andre konfigurationer, der brugte det nominelle input på 40 ng. Konfiguration 3 har mere skade og/eller denaturering, og har derfor en reduceret effektiv masse af brugbare dsDNA-molekyler ved klargøring af bibliotek.

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 3 Konfiguration målrettet mod ultrasonikering evalueret

Parameter	Konfiguration		
	1	2	3
Transducer	Linje	Punkt	Punkt
Volumen for vandbad	5 L	5 L	85 mL
Afgasset vand	Ja	Ja	Nej
Vandkøler	Ja	Ja	Ja
Vandbadets temperatur	7 °C	7 °C	12 °C
Spidseffekt (PIP)	450 W	175 W	50 W
% driftscyklus	30	10	30
Cykusser pr. burst	200	200	1000
Pulsering (10 sekunder burst)	Nej	Nej	Ja
Afklippingstid	250 s	280 s	200 s*
Behandling af prøver	1-8	1	1
Batchstørrelse	1-96	1-96	1-8
Glasrør med en prøvestørrelse på 8 strimler	130 µl	130 µl	50 µl
Ækvivalent DNA-input (til median exondækning)	40 ng	40 ng	50 ng

* Afklippingstiden på 200 sekunder består af 10 sekunders burst med 20 gentagelser.

Temperaturændringshastighed for termocykler

Temperaturændringshastigheden for termocykler påvirker kvalitetskontrolmålinger — Brugbare MSI-steder, median bin-tælling pr. CNV-mål, median insert størrelse (RNA) — samt understøttende læsninger for splejningsvariationer og fusioner. Optimering af temperaturændringshastigheden for termocykler anbefales.

Indhentning, transport og opbevaring af prøver

Følg standardprocedure ved indhentning, transport, opbevaring og behandling af tumorstøvsprøver.

Krav til væv

TSO Comprehensive (EU)-analysen kræver 40 ng RNA og/eller 40 ng DNA ekstraheret fra FFPE-væv. Brug af både RNA og DNA muliggør analyse af alle påståede variationstyper. Væv skal først fikseres ved hjælp af formalinfikseringsvæske egnet til molekylære analyser, f.eks. 10 % neutral bufferformalin. Væv må ikke afkalkes. Inden TSO Comprehensive (EU)-analysen udføres, skal vævet undersøges af en patolog for at sikre, at det er egnet til denne test. Der kræves et tumorindhold på minimum 20 % (efter område) for at detektere

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

somatiske aktiverende mutationer. Der kræves et tumorindhold på minimum 30 % for at detektere MS-høj. Tumorindholdet i genamplifikationer og RNA-varianter afhænger af omfanget af amplifikation eller ekspresion (se [Tumorindhold på side 100](#)).

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

Højt indhold af nekrotisk væv ($\geq 25\%$) kan interferere med TSO Comprehensive (EU)-analysens evne til at detektere genamplifikationer og RNA-fusioner.

Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring

- Ekstraher RNA og DNA fra FFPE-vævsprøver ved hjælp af kommercielt tilgængelige ekstraktionskit. Forskelle i ekstraktionskits kan påvirke ydeevnen. Se [Evaluering af kit til nukleinsyreekstraktion på side 91](#).
- Opbevar ekstraheret stamnukleinsyre i henhold til instruktionerne fra producenten af ekstraktionskittet.
- For at undgå ændringer i koncentrationen over tid skal DNA og RNA måles, lige inden klargøring af bibliotek påbegyndes. Kvantificer RNA og DNA ved hjælp af en metode til fluorometrisk kvantificering, der anvender farvestoffer, som binder nukleinsyre. Nukleinsyrekoncentrationen skal være gennemsnittet af mindst tre målinger.
- Analysen kræver 40 ng af hver RNA-prøve klargjort i RNase/DNase-frit vand (medfølger ikke) med et endeligt volumen på 8,5 μl (4,7 ng/ μl).
- Analysen kræver 40 ng af hver gDNA-prøve med en maksimal ekstraktionskoncentration på 3,33 ng/ μl . Skæring kræver et endeligt volumen på 52 μl (0,77 ng/ μl) med minimum 40 μl TEB (medfølger) brugt som fortynder.

Biblioteksopbevaring

Du kan opbevare biblioteker i PCR-plader med lav binding i 7 til 30 dage, afhængigt af bibliotekstype (se [Tabel 4](#)).

Tabel 4 Opbevaringstider for bibliotek

Bibliotekstype	Plade	Antal dage	Opbevaringstemperatur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Fragmenteret gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C

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

Advarsler og forsigtighedsregler

Sikkerhed

1. **Visse bestanddele af denne analyse indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende nationale love og forordninger.** Du kan se sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
2. Alle prøver skal håndteres, som om de er infektiøse.
3. Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og analysereagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og analysereagenser.

Laboratorie

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

7. Brug præcisionspipetter for at sikre nøjagtig levering af reagens og prøve. Kalibrer regelmæssigt i henhold til producentens specifikationer.
8. Brug følgende retningslinjer ved brug af multikanalpipetter:
 - Pipettér minimum $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Sørg for, at barrierespidserne sidder godt fast og er egnet til multikanalpipettens mærke og model.
 - Fastgør spidserne med en rullende bevægelse for at sikre, at alle spidser sidder lige godt fast.
 - Opsug i en vinkel på 90° med lige volumenniveauer af væske på tværs af alle spidser.
 - Efter dispensering skal det verificeres, at væske dispenseres fra alle spidser.
9. Sørg for at bruge udstyr specificeret til analysen og indstille programmerne som anvist.
10. Angivne temperaturer for termocyklere og mikroprøveinkubatoren indikerer reaktionstemperaturen, ikke nødvendigvis den temperatur, der er angivet for udstyret.

Analyse

1. Undgå krydskontaminering.
 - Følg korrekt laboratoriepraksis ved håndtering af prøver og reagenser.
 - Brug nye engangslaboratorieartikler og pipettespidser mellem hver prøve og mellem dispensering af reagenser.
 - Brug aerosolbestandige spidser for at reducere risikoen for krydskontaminering.
 - Brug en ensrettet arbejdsgang, når du bevæger dig fra områder præ amplifikation til områder post amplifikation.
 - Håndter og åbn kun en indeksprimer ad gangen. Luk hvert indekstrør umiddelbart efter brug. Ekstra hætter følger med kittet.
 - Skift handsker ofte, og hvis de kommer i kontakt med indeksprimere eller prøver.
 - Fjern ubrugte indeksprimerrør fra arbejdsområdet.
 - Reagenser må ikke returneres til opbevaringsrør efter brug med et striprør, en skål eller et reservoir.
 - Bland prøver med en pipette, og centrifuger pladen, hvor det er angivet.
 - Brug en mikroladeomryster. Bland ikke pladerne på vortexblander.
2. Byt ikke om på analysekomponenter fra forskellige reagenskitpartier. Reagenskitpartier er identificeret på mærkaten på æsken til reagenskittet og på masterpartiets ark.
3. Korrekt laboratoriepraksis kræves for at forhindre, at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering, prøver og biblioteker. Kontaminering med nuklease og PCR-produkter kan medføre unøjagtige og upålidelige resultater.
4. Korrekt pladetype kræves for optimal analysegydeevne og opbevaring. Sørg for at følge instruktionerne til overførsel af plade i [Brugervejledning på side 33](#).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

5. Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan medføre fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat biblioteks kvalitet.
6. Fortsæt straks til næste trin, medmindre der er angivet et sikkert stoptidspunkt i [Brugervejledning på side 33](#).
7. Opbevar analysereagenserne og -bestanddelene ved specificerede temperaturer i de angivne områder til anvendelse præ amplifikation og post amplifikation.
8. Opbevar ikke reagenser på et frostfrit opbevaringssted eller i rum i køleskabsdøren.
9. Reagenser, der indeholder perler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.
10. Brug ikke reagenser, der har været opbevaret forkert.
11. Afvig ikke fra de procedurer, der er angivet for blanding og håndtering for hver reagens. Utilstrækkelig blanding eller for lang tids blanding på vortexblander kan medføre mislykkede prøveresultater.
12. Klargør friske masterblandinger, og kassér det resterende volumen efter brug.
13. Klargør altid frisk 80 % ethanol med RNase/DNase-frit vand til vasketrinnene. Ethanol kan absorbere vand fra luften, hvilket kan påvirke resultaterne. Kassér 80 % ethanol efter brug i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale regulativer.
14. Overfør det angivne volumen af eluat. Overførsel af mindre end det angivne volumen af eluat under elueringstrinnene kan påvirke resultaterne.
15. Brug følgende retningslinjer for ultrasonikatorer. Sørg for at følge producentens instruktioner.
 - Tilføj gDNA til ultrasonikatorrøret langsomt for at undgå, at der dannes bobler. Overdrejet mange bobler eller en luftlomme i røret til afklipping kan føre til ufuldstændig fragmentering.
 - Dispensér til ultrasonikatorrør langsomt, og undgå at sprøjte.
 - For at undgå væskeforskydning og tab af prøve må pipettespidsen ikke indsættes i bunden af ultrasonikatorrøret ved fjernelse af fragmenteret DNA.
16. Pipettér ikke mindre end 2 µl prøveinput.
17. Brug ikke en skål til at dispensere reagenser i trin, der kræver tilførsel af mindre end 10 µl materiale til hver prøvebrønd.
18. Brug en P20-pipette ved overførsel af fragmenteret gDNA-prøve fra ultrasonikatorrørene til LP-pladen.
19. UMI- og SUA1-adaptore må ikke kombineres.
20. Brug SUA1-adaptore sammen med RNA-prøver.
21. Brug UMI-adaptore sammen med DNA-prøver.
22. Tildel forskellige indeksprimere til hver biblioteksprøve for unik identifikation af hvert bibliotek, når det samles til sekventering på en enkelt flowcelle.
23. CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i samme bibliotek.
24. Uoverensstemmelser mellem prøver og indeksprimere medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve. Indtast prøve-ID'er, og tildel indekser i Local Run Manager, inden du begynder klargøring af biblioteket. Registrer prøve-ID'er, indeksering og retning for pladebrønd som reference under klargøring af bibliotek.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

25. For biblioteker afledt fra RNA-prøver skal der kun bruges UPxx-indekser.
26. For biblioteker afledt fra DNA-prøver skal der bruges UPxx-indekser eller CPxx-indekser.
27. Sekventer 8 RNA- biblioteker og 8 DNA-biblioteker pr. flowcelle. Se [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#).
28. Sekventer mindst tre biblioteker. Følg retningslinjerne i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#).
29. Efter bindingstrinnene i [Indfangning af Targets One på side 59](#) og [Indfangning af Targets Two på side 62](#) skal du med det samme fortsætte til vasketrinnet for at forhindre, at perlepelleten tørrer.
30. Under vasketrinnene skal det sikres, at alt 80 % ethanol fjernes fra bunden af brøndene. Resterende ethanol kan påvirke resultaterne.
31. Følg de angivne antal vaske specificeret i [Brugervejledning på side 33](#) for at opnå optimal analysegydeevne.
32. Under proceduren [Normalisering af biblioteker på side 68](#) skal bibliotekets perlepellet resuspenderes meget omhyggeligt for at opnå ensartet clusterdensitet på flowcellen.

Noter til fremgangsmåde

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

Termocyklerens programmer

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Påføring og fjernelse af forsegling på pladen

- Forsegl altid pladerne med en ny, selvklæbende pladeforsegler. Forseglinger må ikke genbruges.
- Pladen forsegles ved på sikker vis at påføre det selvklæbende overtræk med en kile eller rulle til forsegling.
- Forsegl altid 96-brønds pladen med ny, selvklæbende pladeforsegler, inden følgende trin i protokollen udføres.
 - Trin for pladeomrystning
 - Centrifugeringstrin
 - Termocyklertrin
 - Hybridiseringer
 - Langtidsopbevaring
- Sørg for, at kanterne og brøndene er forseglede, for at reducere risikoen for krydskontaminering og fordampning.
- Placer pladen på en jævn overflade, inden forseglingen fjernes forsigtigt.
- Centrifuger ved $280 \times g$ i 1 minut, inden forseglingen fjernes, hvis der observeres væske eller kondensdannelse på forseglingen eller brøndenes sidevægge.
- Brug selvklæbende pladeforseglere, der er effektive ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ og egnet til PCR-plader med skørt eller halvskørt.

Udstyr

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

Pladetype og overførsler af plade

- Korrekt pladetype kræves for optimal analysegydeevne og opbevaring.
- Ved overførsel af volumener mellem plader skal det specificerede volumen fra hver brønd i en plade overføres til den tilsvarende brønd i destinationspladen.
- Multikanalpipetter kan anvendes ved overførsel af prøver mellem rørstrips eller plader.
- Brug følgende retningslinjer ved omrystning af plader.
 - Brug en pladeomryster til at omryste pladerne. Bland ikke pladerne på vortexblander.
 - Omryst PCR-plader ved 1200 o/min.
 - Omryst MIDI-plader ved 1800 o/min.
 - Følg producentens instruktioner for at sikre, at pladeomrysteren holder pladen sikkert.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Centrifugering

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

Håndtering af reagenser

- Luk alle reagensrør tæt til umiddelbart efter brug for at begrænse fordampning og forhindre kontaminering.
- Sæt reagenserne tilbage ved de angivne opbevaringstemperaturer, når der ikke længere er behov for dem i en procedure.
- Følg reagensklargøringen, der går forud for afsnittet procedure i [Brugervejledning på side 33](#).
- Sørg for at klargøre det krævede volumen af masterblanding, elueringsblanding og 80 % ethanol til det antal prøver, du behandler.
- Volumener angivet i tabeller over masterblanding og opløsning indeholder overskud. Overskud af volumen beregnes som følger.
 - [Tabel 13](#)
 - Volumen af FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antal prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - Volumen af FSM = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{antal prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25)$.
 - [Tabel 19](#)
 - Volumen af ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,20)$.
 - Volumen af ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,20)$.
 - [Tabel 26](#)
 - Volumen af EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabel 27](#)
 - Volumen af EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabel 32](#)
 - Volumen af LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (2,0)$.
 - Volumen af LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (2,0)$.
 - [Tabel 33](#)
 - Volumen af EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,25)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,25)$.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Adaptersæt

- TSO Comprehensive (EU)-analysen inkluderer UMI-adaptore og SUA1-adaptore.
- SUA1-adaptore er til brug med RNA-prøver, ikke til DNA.
- UMI-adaptore er til brug med DNA-prøver, ikke til RNA.

Håndtering af perler

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Laboratoriesporingsformular

- *TruSight Oncology Comprehensive (EU)-laboratoriesporingsformularen (dokument # 200009022) giver en tjekliste til protokoltrinnene.*

Antal biblioteker og valg af indekser

Planlæg antallet af prøvebiblioteker og prøveindekser for sekventeringskørslen inden kørselskonfiguration. De følgende retningslinjer for antal prøver inkluderer positive kontroller, men indeholder ikke kontroller uden skabelon (NTC'er). NTC'er kan imidlertid tilsættes til flowcellen som en yderligere prøve.

Tag højde for følgende retningslinjer ved bestemmelse af antallet af biblioteker, når der sekventeres på en flowcelle.

Tabel 5 RNA- eller DNA-biblioteker for TSO Comprehensive (EU)

Bibliotekstype	Minimum*	Maksimum
RNA	3	16
DNA	3	8

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

Tabel 6 RNA- og DNA-biblioteker kombineret til TSO Comprehensive (EU)

Antal DNA- biblioteker	Antal RNA- biblioteker
8	8

Tilsæt indeksprimer til hvert prøvebibliotek under biblioteksklargøring. **Brug forskellige indeksprimerblandinger til hvert prøvebibliotek.** Indeksprimere identificerer hver prøve unikt, således at hvert bibliotek kan samles til sekventering på en flowcelle. (Kompatible indeksskombinationer vises på skærmen Create Run (Opret kørsel) under kørselskonfigurationen af Local Run Manager-softwaren.)

Sørg for, at de indeksprimere, du bruger med prøverne, matcher de indekser, du vælger til analyse med Local Run Manager. **Uoverensstemmelser medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve.**

TSO Comprehensive (EU)-kittet indeholder to typer indekser.

- **UPxx-indekser** – For biblioteker afledt fra RNA- eller DNA-prøver skal der bruges UPxx-indekser.
- **CPxx-indekser** – Brug CPxx-indekser til biblioteker afledt fra DNA-prøver. Brug ikke CPxx-indekser til biblioteker afledt fra RNA-prøver eller ved sekventering af i alt tre DNA-biblioteker.

Følgende kræves, hvis der kun sekventeres tre biblioteker.

- Alle bibliotekerne skal være DNA eller RNA.
- Brug ikke CPxx-indekssæt.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- Der kræves et af de følgende UPxx-indekssæt for at give tilstrækkelig diversitet.
 - UP01, UP02 og UP03
 - UP04, UP05 og UP06
 - UP07, UP08 og UP09
 - UP10, UP11 og UP12

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

TruSight Oncology-kontroller

TSO Comprehensive (EU) kræver brug af TruSight Oncology-kontroller, der består af TruSight Oncology DNA-kontrol og TruSight Oncology RNA-kontrol som positive kontroller. Omfatter TruSight Oncology DNA-kontrol for hver DNA-sekventeringskørsel og TruSight Oncology RNA-kontrol for hver RNA-sekventeringskontrol i et givent, klargjort bibliotek (inkluder også kontroller for kombinerede DNA- og RNA-kørsler). Der klargøres en unik, positiv kontrol for hver planlagte sekvenskørsel.

Inkluder en NTC i hvert RNA og hver DNA-biblioteksforberedelse. NTC'en sekventeres gentagne gange i et klargjort bibliotek. Følg retningslinjerne herunder for TruSight Oncology-kontroller.

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

I tabellen herunder vises eksempler på pladelayouts til klargøring af bibliotek. Hver nummererede kolonne repræsenterer en enkelt sekventeringskørsel. Når DNA- og RNA-biblioteker sekventeres sammen, repræsenterer hvert sammenhængende sæt af kolonner en enkelt sekventeringskørsel (f.eks. kolonne 1 og kolonne 7). NTC'en sekventeres for hver kolonne eller hvert sæt af kolonner.

Tabel 7 Klargjort bibliotek i en enkelt kørsel inklusive seks patientprøver

	1	2	3	4	5	6	7
A	Positiv DNA- kontrol	tom	tom	tom	tom	tom	Positiv RNA- kontrol
B	DNA 1	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 1

C	DNA 2	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 2
D	DNA 3	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 3
E	DNA 4	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 4
F	DNA 5	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 5
G	DNA 6	tom	tom	tom	tom	tom	RNA 6
H	DNA NTC	tom	tom	tom	tom	tom	RNA NTC

Tabel 8 Klargjort bibliotek i tre kørsler inklusive 20 patientprøver

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

Brugervejledning

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

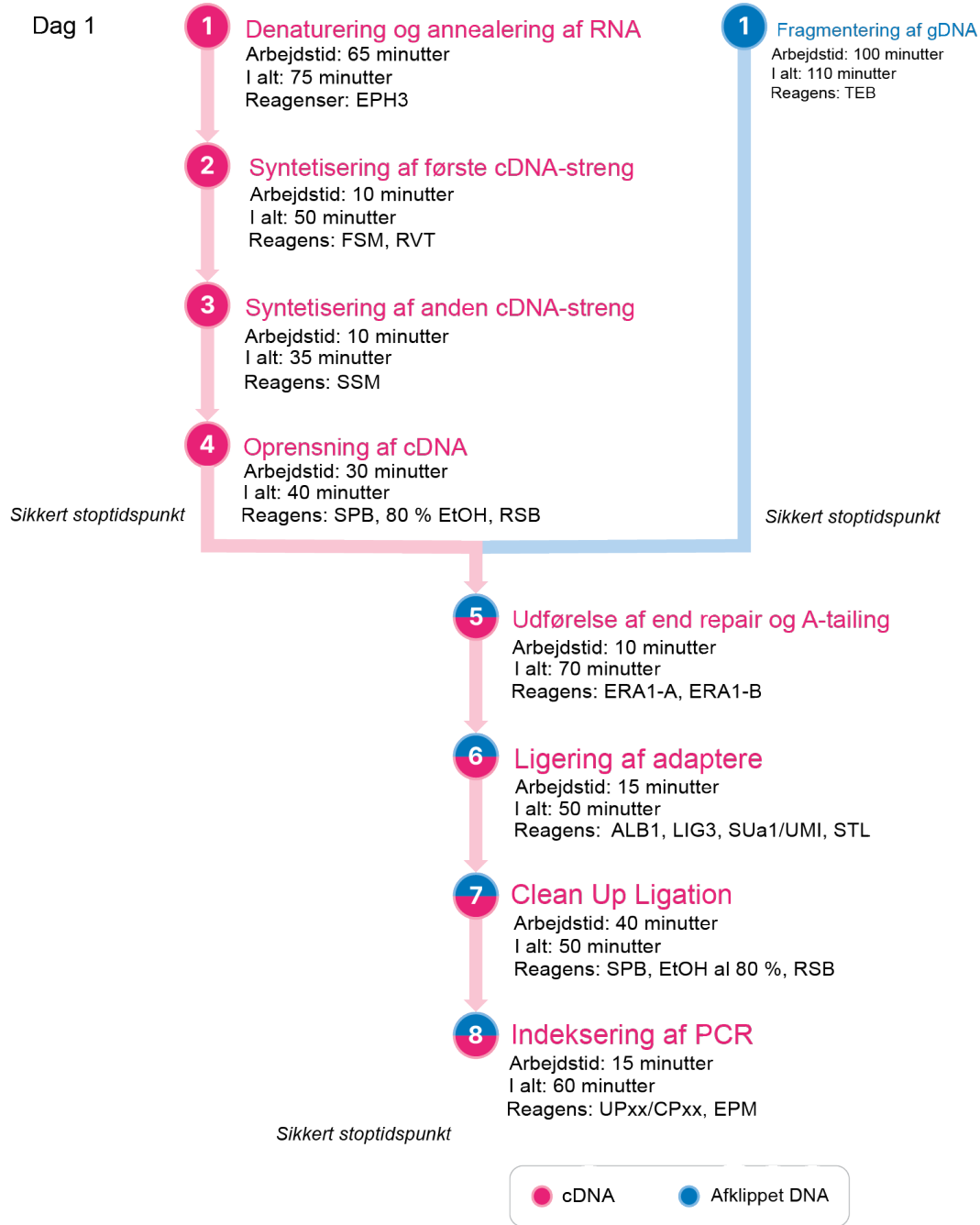
Arbejdsgang til klargøring af bibliotek

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

Før du starter protokollen, skal du enten køre og prøvetage information i et v2-prøveark, der skal bruges med Local Run Manager-softwaren. Se [Indtastning af kørselsoplysninger på side 37](#).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Figur 1 TSO Comprehensive (EU)-arbejdsgang (del 1)

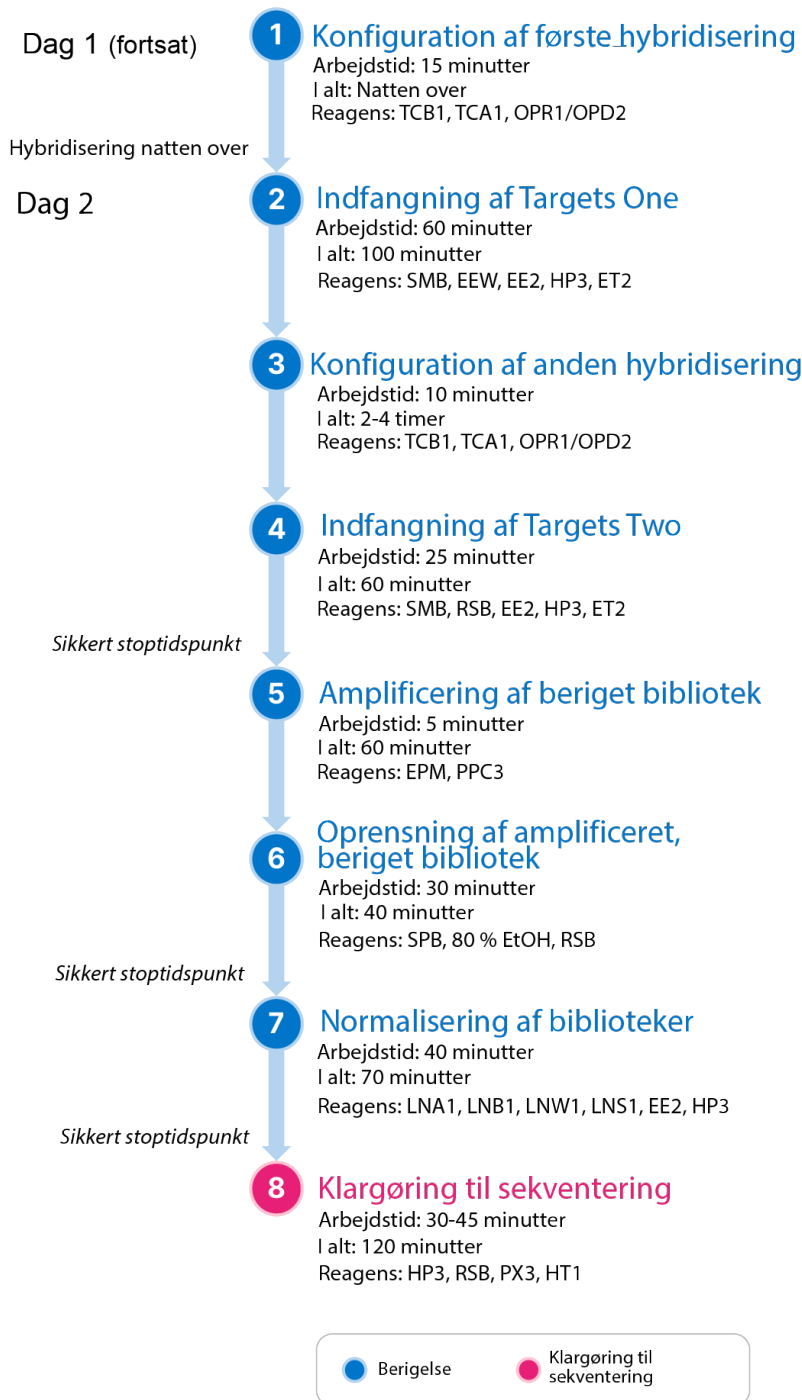


* Arbejdstider og tider i alt er omtrentlige.

Arbejdsgang for berigelse

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

Figur 2 TSO Comprehensive (EU)-arbejdsgang (del 2)



Programmer termocykler

Inden analysen startes, skal følgende programmer gemmes på termocykler præ og post amplifikation.

Tabel 9 Programmer på termocykler præ amplifikation

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

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

Tabel 10 Programmer på termocykler post amplifikation

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Indeksring af PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 cyklusser a: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • 10 °C Oprethold

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Foretag første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 57 °C Oprethold i 8 til 24 timer
Foretag anden hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 57 °C Oprethold i 1,5 til 4 timer
Amplificering af beriget bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 s • 18 cyklusser a: • 98 °C i 10 s • 60 °C i 30 s • 72 °C i 30 s • 72 °C i 5 min • 10 °C Oprethold

Indtastning af kørselsoplysninger

NextSeq 550Dx-instrument Local Run Manager er den software, der bruges til at opsætte TSO Comprehensive (EU)-analysekørsler. Se Vejledning til arbejdsgang i *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)* for at få mere at vide.

Indtast oplysninger om konfiguration af kørsel og prøve direkte i TSO Comprehensive (EU) Analysis Module.

Konfiguration af kørselsparametre

1. Log ind på Local Run Manager på instrumentet eller fra en netværkscomputer.
2. Vælg **Create Run** (Opret kørsel), og vælg derefter **TSO Comp (EU)**.
3. Indtast et kørselsnavn, der identificerer kørslen fra sekventeringen til og med analysen, under hensyntagen til følgende kriterier.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- 1-40 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn, understregningstegn og bindestreger.
 - Understregningstegn og bindestreger skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.
 - Unikt på tværs af alle kørsler på instrumentet.
4. [Valgfrit] Indtast en kørselsbeskrivelse, der gør det lettere at identificere kørslen, under hensyntagen til følgende kriterier.
- 1-150 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn og mellemrum.
 - Mellemrum skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.

Angivelse af prøver til kørslen

Du angiver prøver til kørslen ved at anvende en af følgende muligheder.

- **Indtast prøverne manuelt** – Brug den tomme tabel på skærmen Create Run (Opret kørsel). Du kan se alle de understøttede prøvekonfigurationer i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#).
- **Importér prøver** – Gå til en ekstern fil i et kommasepareret værdiformat (*.csv). Du kan downloade en skabelon på skærmen Create Run (Opret kørsel).



FORSIGTIG

Uoverensstemmelser mellem prøverne og indeksprimerne kan resultere i ukorrekt resultatrapportering på grund af manglende positiv prøveidentifikation. Indtast prøve-ID'er, og tildel indekser i Local Run Manager, inden du begynder klargøring af biblioteket. Registrer prøve-ID'er, indekser og pladebrøndsorientering til senere brug i forbindelse med biblioteksklargøringen.



FORSIGTIG

For at undgå datatab skal du sørge for, at en videnbase ikke er ved at blive installeret, inden en kørsel gemmes.

Manuel indtastning af prøver

1. Indtast et unikt prøve-ID i feltet Sample ID (Prøve-ID) under hensyntagen til følgende kriterier.
Alle kontrolprøver skal tilsættes først. Se [Kontrolprøver på side 40](#) for at få mere at vide.
 - 1-25 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn, understregningstegn og bindestreger.
 - Understregningstegn og bindestreger skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.
2. [Valgfrit] Indtast en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse) under hensyntagen til følgende kriterier.
 - 1-50 tegn.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- Kun alfanumeriske tegn, bindestreger, understregningstegn og mellemrum.
 - Mellemrum, understregningstegn og bindestreger skal forudgå og efterfølges af et alfanumerisk tegn.
3. Vælg et indeks til det DNA- bibliotek og/eller RNA-bibliotek, du har klargjort fra prøven.
Sørg for, at RNA- og DNA- prøverne er i separate kolonner.
Feltet DNA i7+i5 Sequence (DNA i7+i5-sekvens) bliver automatisk udfyldt efter valg af et DNA-indeks-ID.
Feltet RNA i7+i5 Sequence (RNA i7+i5-sekvens) bliver automatisk udfyldt efter valg af et RNA-indeks-ID.
Udover denne oversigt kan du se [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#) vedrørende valg af indeks-ID.
- DNA-prøvebibliotek: Vælg et unikt indeks-ID (UPxx- eller CPxx-indeks) på rullelisten DNA Index ID (DNA-indeks-ID).
 - RNA-prøvebibliotek: Vælg et unikt indeks-ID (kun UPxx-indeks) på rullelisten RNA Index ID (RNA-indeks-ID).
 - Hvis der er tre biblioteker i alt i kørslen, skal du følge vejledningen til valg af indeks i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#).
4. I feltet Tumor Type (Tumortype) tildeler du en tumortype til hver prøve, idet du vælger den mest specifikke af de tilgængelige tumortyper. Se [Valg af tumortype på side 40](#).
5. I feltet Tumor Type (Tumortype) tildeler du en af følgende kontroltyper til hver kontrol. Se [Kontrolprøver på side 40](#).
- DNA External Control (DNA, ekstern kontrol)
 - RNA External Control (RNA, ekstern kontrol)
 - DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol)
 - RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol)
- Ved brug af TruSight Oncology DNA- kontrol, er kontroltypen DNA, ekstern kontrol. Ved brug af TruSight Oncology RNA -kontrol, er kontroltypen RNA, ekstern kontrol.
6. Tildel køn.
7. [Valgfrit] Vælg **Export to CSV** (Eksportér til CSV) for at eksportere prøveoplysningerne til en ekstern fil.
8. Gennemse oplysningerne på skærmen Create Run (Opret kørsel).
Forkerte oplysninger kan påvirke resultaterne.
9. Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Import af prøver

1. Vælg **Import CSV** (Importér CSV), og gå til den placering, hvor prøveoplysningsfilen ligger. Der er to typer filer, du kan importere.
- Vælg **Download CSV** på skærmen Create Run (Opret kørsel) for at downloade en ny prøveoplysningsskabelon. CSV-filen indeholder de påkrævede kolonneoverskrifter og det påkrævede format til import. Indtast prøveoplysninger i hver kolonne om prøverne i kørslen. I kolonnen Tumor Type

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

(Tumortype) skal du indtaste termen for tumortypen eller den tilhørende kode (se [Download tumortyper på side 42](#)). Feltet Tumor Type (Tumortype) anvendes også til at angive prøver som kontroller (se [Kontrolprøver på side 40](#)).

- Brug en fil med prøveoplysninger, der blev eksporteret fra Local Run Manager ved hjælp af funktionen Export to CSV (Eksportér til CSV).
2. Gennemse de importerede oplysninger på skærmen Create Run (Opret kørsel). Forkerte oplysninger kan påvirke resultaterne.
 3. [Valgfrit] Vælg **Export to CSV** (Eksportér til CSV) for at eksportere prøveoplysningerne til en ekstern fil.
 4. Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Kontrolprøver

TSO Comprehensive (EU) kræver brug af TruSight Oncology Controls Ved angivelse af en prøve som kontrol bliver prøvens køn automatisk sat til Unknown (Ukendt). For at udpege en prøve som en kontrol skal du vælge én af fire kontroltyper fra feltet Tumor Type (Tumortype):

- DNA External Control (positive DNA control) (DNA, ekstern kontrol (positiv DNA-kontrol))
- DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol)
- RNA External Control (positive RNA control) (RNA, ekstern kontrol (positiv RNA-kontrol))
- RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol)

Du kan finde yderligere oplysninger om konfiguration af tumortyper for alle prøvetyper i forbindelse med kørselskonfigurationen under [Valg af tumortype på side 40](#).

Der kan kun angives én af hver kontroltype inden for en kørsel. Der kan kun angives et DNA-bibliotek for en DNA External Control (DNA, ekstern kontrol) eller en DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol). Der kan kun angives et RNA-bibliotek for en RNA External Control (RNA, ekstern kontrol) eller en RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol). DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol) eller RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol) bliver ikke modregnet i det maksimale antal biblioteker i en kørsel.

Valg af tumortype

Der skal angives en tumortype for hver prøve. Med undtagelse af kontroltyperne er de tilgængelige tumortyper afledt fra den installerede videnbase og kan ændre sig i forbindelse med opdaterede versioner af videnbasen.



FORSIGTIG

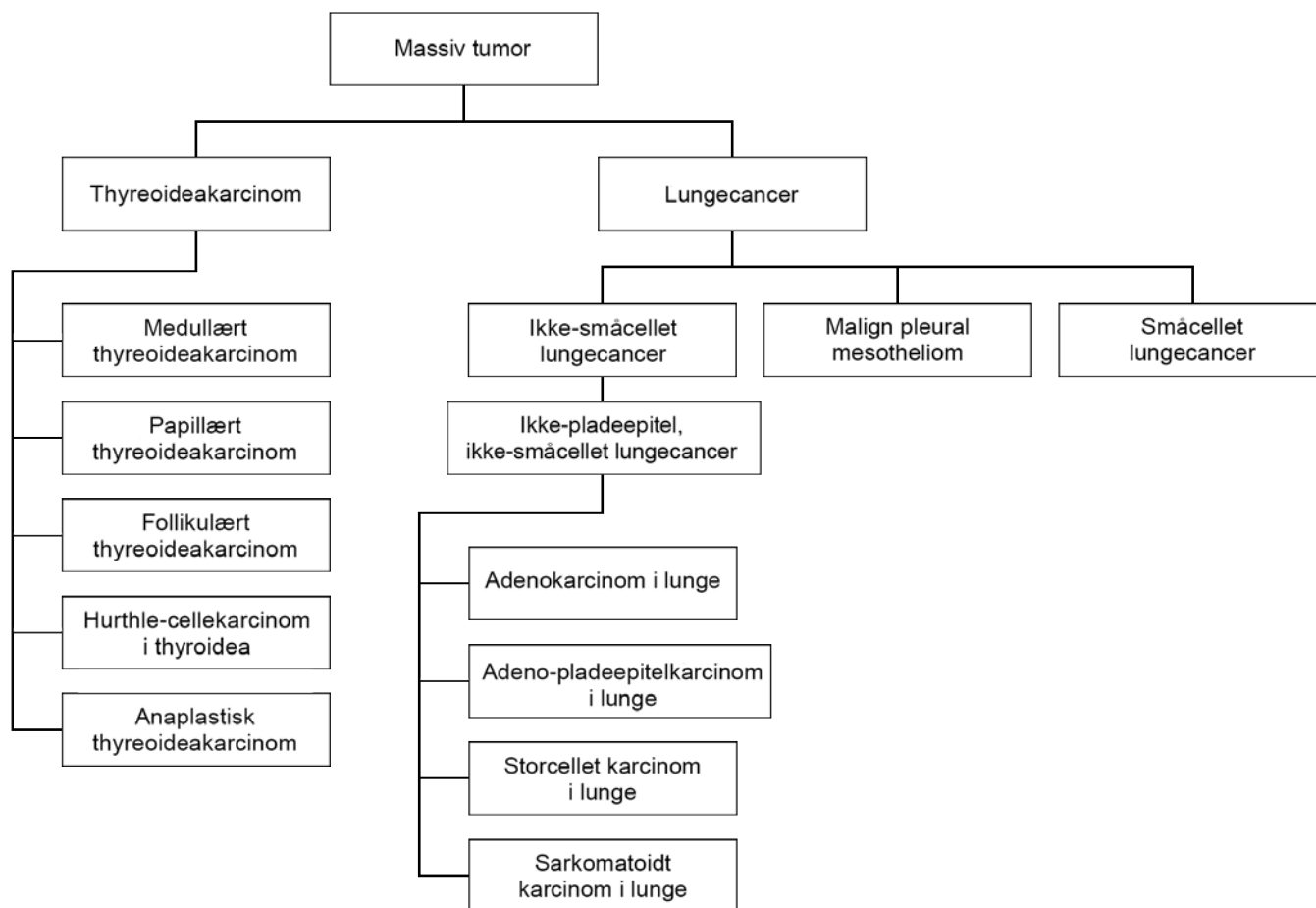
Ukorrekt valg af tumortype kan medføre ukorrekte resultater. Afhjælp alle advarsler, der bliver vist i forbindelse med angivelse af tumortyper, for at undgå analysefejl.

Tumortype-terminerne er en del af en hierarkisk sygdomsontologi i videnbasen, som er opbygget som et sæt overordnede/underordnede relationer. Eksempel: Termen ikke-småcellet lungecancer er en underordnet lungecancer, eftersom ikke-småcellet lungecancer er en type lungecancer. [Figur 3](#) illustrerer et eksempel på et

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

undersæt af en sygdomsontologi, der viser solid tumor som rod-terminen og de termer, der er forbundet med lungecancer og thyreoideacancer (andre tumortyper er ikke vist). En term, der er forbundet via overordnede/underordnede relationer til en term på et lavere niveau, kaldes en ascendent. De forbundne termer på lavere niveauer er descendenter til ascendent-terminen. Eksempel: Lungecancer er ascendent til adenokarcinom i lungen og småcellet lungecancer, og medullært thyreoideakarcinom er descendent til både thyreoideakarcinom og solid tumor.

Figur 3 Eksempel på et undersæt af en sygdomsontologi



Den valgte tumortype for en patientprøve har indvirkning på:

- Hvilke påtænkte anvendelser af ledsagende diagnostiske test, der bliver evalueret for prøven. Kun patientprøver, der har den eksakt samme tumortype som tumortypen for den påtænkte anvendelse af ledsagende diagnostiske test, eller er en descendent dertil, bliver evalueret for dette krav.
- Hvilke tumorprofileringsvariationer, der er inkluderet i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Nedenstående vejledning beskriver fremgangsmåden til valg af tumortype via skærmen Create Run (Opret kørsel). Tumortypen kan også konfigureres ved at importere en CSV-fil, der indeholder en tumortype (se [Import af prøver på side 39](#)).

1. Dobbeltklik i cellen Tumor Type (Tumortype) i rækken for den relevante prøve for at få vist de tilgængelige tumortyper. De tilgængelige tumortyper vises på en hierarkisk liste, der er sorteret alfabetisk.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Feltet Tumor Type (Tumortype) bruges også til at angive en kontroltype for kontrolprøver (se [Kontrolprøver på side 40](#)).

- Find og vælg den ønskede tumortype ved hjælp af listen eller ved hjælp af søgelinjen øverst i vinduet Tumor Type (Tumortype).

Download tumortyper

Du kan downloade en fuld liste over tilgængelige tumortyper i TSV-format fra skærmen Create Run (Opret kørsel) ved hjælp af knappen **Download Tumor Types TSV** (Download tumortype-TSV). Listen indeholder følgende oplysninger:

- Den tumortype-term, der kan ses på brugergrænsefladen.
- Den komplette sti for tumortypen i tumortypehierarkiet (sygdomsontologi).
- Den kode, som Local Run Manager bruger til at identificere tumortypen.

Klargøring til protokoltrin

- Dekontaminer arbejdsområderne grundigt med et RNase/DNase-inhiberende rensemiddel.



FORSIGTIG

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

- Indstilling af termocyklerens programmer præ-amplifikation. Se [Programmer termocykler på side 36](#)
- Følg producentens instruktioner for at konfigurere ultrasonikatoren.
- Hvis der udelukkende behandles DNA-prøver, skal du fortsætte direkte til [Fragmentering af gDNA på side 47](#).
- Hent RNA- kontrollerne fra opbevaringen.
- Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 11 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
EPH3	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Denaturering og annealering af RNA
FSM	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Syntetisering af første cDNA-streng
RVT	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Syntetisering af første cDNA-streng
SSM	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Syntetisering af anden cDNA-streng

Tabel 12 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

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

Denaturering og annealering af RNA

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

Klargøring

- Klargør følgende reagenser.
 - EPH3 – Sæt til side.
 - FSM – Bland på vortexblander. Centrifuger kortvarigt, og bland ved pipettering. Inspicer for bundfald. Hvis der er bundfald, skal du blande ved pipettering, indtil bundfaldet opløses.
 - RVT – Centrifuger kortvarigt, og bland ved pipettering. Opbevares på is.

BEMÆRK! RVT er en viskøs opløsning. Pipetter altid langsomt for at undgå, at der dannes bobler.

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

Tabel 13 FSM+RVT-masterblanding

Bestanddel i masterblandingen	4 RNA-prøver (µl)	8 RNA-prøver (µl)	16 RNA-prøver (µl)	24 RNA-prøver (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 29](#) for beregninger.

- Bland ti gange ved pipettering.
- Placer FSM+RVT-masterblandingen på is indtil [Syntetisering af første cDNA-streng på side 44](#).

Fremgangsmåde

- Optø ekstraherede RNA-prøver og RNA-kontroller på is.
RNA-kontroller skal behandles som prøver i den resterende del af protokollen.
- Opbevar RNA på is, når det ikke er i brug. Se [Krav til væv på side 22](#) for at kvantificere prøver.
- Bland hver RNA-prøve 10 gange ved pipettering.
- Brug RNase/DNase-frit vand til at klargøre 40 ng af hver RNA-prøve i et endeligt volumen på 8,5 µl (4,7 ng/µl).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

For RNA-kontroller skal du bruge den koncentration, der er angivet på rørets mærkat.

5. Markér en ny 96-brønds PCR-plade CF (cDNA Fragments – cDNA-fragmenter).
6. Tilføj 8,5 µl af hver RNA-prøve til en unik brønd i CF PCR-pladen.
7. Kontrollér, at prøvepladens layout og indekser for hver prøve svarer den kørsel, der er planlagt i Local Run Manager under kørselskonfigurationen.
8. Bland EPH3 på vortexblander, og centrifugér kortvarigt.
9. Tilføj 8,5 µl EPH3 til hver prøvebrønd.
10. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR- pladen.



FORSIGTIG

Sørg for at forsegle kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

11. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
12. Centrifugér ved 280 × g i 1 minut.
13. Placer på termocyklerin, og kørsel LQ-RNA-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 36](#).
14. Når prøverne er 4 °C, skal de opretholdes ved denne temperatur i et minut, og derefter skal du straks fortsætte til næste trin.

Syntetisering af første cDNA-streng

Denne proces anvendes til revers transkription af RNA-fragmenter med vilkårlige hexamerer til første cDNA-streng ved hjælp af revers transkriptase.

Fremgangsmåde

1. Fjern CF PCR-pladen fra termocyklerin.
2. Bland FSM+RVT-masterblandingen 5 gange ved pipettering.
3. Tilføj 8 µl FSM+RVT-masterblanding til hver brønd.
4. Bland 5 gange ved pipettering.
5. Kassér den resterende FSM+RVT-masterblanding.
6. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR- pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
7. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
8. Centrifugér ved 280 × g i 1 minut.
9. Placer på en termocykler, og kørsel 1stSS-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 36](#).
10. Når prøverne er 4 °C, skal du straks fortsætte til næste trin.
Prøver af første streng kan opretholdes ved 4 °C i op til 5 minutter.

Syntetisering af anden cDNA-streng

Denne proces fjerner RNA-skabelonen og syntetiserer dobbeltstrenget cDNA.

Klargøring

1. Klargør følgende reagens.
 - SSM – Vend og op ned 10 gange for at blande. Centrifuger kortvarigt.

Fremgangsmåde

1. Fjern CF PCR-pladen fra termocyklern.
2. Tilføj 25 µl SSM til hver prøvebrønd.
3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
4. Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
5. Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
6. Placer på en termocykler, og kørs 2ndSS-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 36](#).
7. Når prøverne er 4 °C, skal de opretholdes ved denne temperatur i et minut, og derefter skal du straks fortsætte til næste trin.

Oprensning af cDNA

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

Klargøring

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

Reagens	3 prøver	8 prøver	16 prøver	24 prøver
100 % ethanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-frit vand	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
4. Marker en ny 96-brønds MIDI-plade BIND1 (cDNA Binding - cDNA-binding).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

5. Dæk til, og sæt til side.
6. Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern CF PCR-pladen fra termocyklern.
2. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
3. Tilføj straks 90 µl SPB til hver prøvebrønd i BIND1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,05 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
4. Overfør hele volumen (50 µl) af hver prøve fra CF PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND1 MIDI-pladen.
5. Kassér den tomme CF PCR-plade.
6. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
7. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
8. Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter.
9. Placer BIND1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
10. Brug en 200 µl P200-pipette til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Bibehold perlerne på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Fjern resterende EtOH fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluer

1. Fjern BIND1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

3. Tilføj 22 µl RSB til hver prøvebrønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND1 MIDI-pladen.
Forsøgl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
6. Inkuber ved stuetemperatur i 2 minutter.
7. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade PCF (Purified cDNA Fragments – Oprensede cDNA-fragmenter).
Hvis du stopper ved [SIKKERT STOPTIDSPUNKT på side 47](#), skal du bruge en PCR-plade.
9. Overfør 20 µl eluat fra hver prøvebrønd i BIND1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PCF-pladen.
10. Kassér den tomme BIND1 MIDI-plade.
11. Tilføj 30 µl RSB til hver prøvebrønd i PCF-pladen.
12. Bland 10 gange ved pipettering.
13. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PCF-pladen, og opbevar den på is.
14. Sæt EPH3, FSM, RVT og SSM tilbage til opbevaring.
15. Hvis du kun behandler prøver afledt af RNA (cDNA) og ikke stopper ved det sikre stoptidspunkt, skal du fortsætte til [Udførelse af end repair og A-tailing på side 50](#).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargøring til protokoltrin

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

Tabel 14 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TEB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Fragmentering af gDNA

Fragmentering af gDNA

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

Klargøring

1. Sørg for at følge anbefalingerne i [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23](#) for at kvantificere prøver.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

2. Klargør følgende reagens.

- TEB – Vend op og ned, eller bland på vortexblander.

Fremgangsmåde

Klargør pladen

1. Vælg én af de følgende tre muligheder for at klarlægge pladen.

- **Mulighed nr. 1:** gDNA-prøver behandles sammen med cDNA-prøver i PCF MIDI-pladen.
 - a. Markér PCF MIDI-pladen LP (Library Preparation – Biblioteksklargøring).
 - b. Placer på is, og sæt til side til brug i [Overfør fragmenteret DNA på side 49](#).
- **Mulighed nr. 2:** gDNA-prøver behandles sammen med cDNA-prøver, og PCF PCR-pladen fryses.
 - a. Optø PCF PCR-pladen til stuetemperatur.
 - b. Centrifuger ved $280 \times g$ i 1 minut.
 - c. Bland 10 gange ved pipettering.
 - d. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP (Library Preparation – Biblioteksklargøring).
 - e. Overfør alle 50 µl af hver prøve fra PCF PCR-pladen til den tilsvarende brønd i LP MIDI-pladen.
 - f. Kassér PCF PCR-pladen.
 - g. Påfør selvklæbende forseglers, og placer på is indtil [Overfør fragmenteret DNA på side 49](#).
- **Mulighed nr. 3:** Prøver, der udelukkende indeholder gDNA, behandles.
 - a. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP (Library Preparation – Biblioteksklargøring).
 - b. Hvis du stopper ved [SIKKERT STOPTIDSPUNKT på side 49](#), skal du bruge en PCR-plade.
 - c. Dæk til, og sæt til side til brug i [Overfør fragmenteret DNA på side 49](#).

Fortynd gDNA

1. Optø gDNA-prøver og DNA-kontroller ved stuetemperatur.
DNA-kontroller skal behandles som prøver i den resterende del af protokollen.
2. Bland hver gDNA-prøve 10 gange ved pipettering.
3. Centrifuger røret kortvarigt for at opsamle små dråber.
4. Vend TEB op og ned, eller bland på vortexblander.
5. Brug TEB til at klarlægge hver gDNA-prøve i et endeligt volumen på 52 µl (0,77 ng/µl). Se følgende tabel for inputmængder og minimumkoncentrationer baseret på prøvetype. Analysen kræver minimum ekstraktion af en koncentration for at tillade mindst 40 µl TEB af volumenet på 52 µl. Ved DNA-kontroller skal du bruge den koncentration, der er angivet på mærkaten på røret. For at forhindre prøvetab må der ikke tilføjes mindre end 2 µl prøve ved pipettering til denne fortynding.

Prøvetype	Inputmængde (ng)	Minimumkoncentration (ng/μl)
FFPE	40	3.33

Fragmentér

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



FORSIGTIG

Tilføj gDNA'et til røret langsomt, og sørg for, at der ikke er nogen bobler i røret, og at der ikke er nogen luftlommer i bunden af røret. Se [Analyse på side 25](#) og producentens instruktioner for at få mere at vide.

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

Overfør fragmenteret DNA

1. Kontrollér, at prøvepladens layout og indekser for hver prøve svarer den kørsel, du vælger til analyse med TSO Comprehensive (EU)-analysemodulet.
2. Følg instruktionerne fra producenten af ultrasonikatoren for at gendanne prøven.
For visse typer ultrasoniske rør kan centrifugering være nødvendig for at samle prøven i røret.
3. For hver fragmenterede gDNA-prøve skal du bruge en p20-pipette med fine spidser til at foretage tre overførsler på 16,7 μl til en tom brønd i LP MIDI-pladen.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP MIDI-pladen.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargøring til protokoltrin

Sørg for, at termocyklerens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 36](#)

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 15 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Æske (PN 20031118)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
ERA1-A	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Udførelse af end repair og A-tailing
ERA1-B	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Udførelse af end repair og A-tailing
ALB1	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptore
LIG3	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Ligering af adaptore
SUA1 (blå hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptore
UMI (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptore
STL	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptore
EPM	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Indeksering af PCR

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Æske (PN 20031119)

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

Tabel 17 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Æske (PN 20031120)

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

Tabel 18 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Æske (PN 20031126)

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

Udførelse af end repair og A-tailing

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

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

Klargøring

1. Forvarm 2 mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmebloksindsatser som følger.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
2. Klargør følgende reagenser.
 - ERA1-A – Centrifuger kortvarigt, og bland derefter ved pipettering. Opbevares på is.
 - ERA1-B – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt. Inspicer for bundfald. Hvis der er bundfald, skal du opvarme røret til 37 °C og derefter blande ved pipettering, indtil bundfaldet opløses.

3. Klargør ERA1-masterblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 19 ERA1-masterblanding

Bestanddel i masterblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 29](#) for beregninger.

4. Bland 10 gange ved langsom pipettering, centrifuger kortvarigt, og placer herefter ERA1-masterblandingen på is.
5. Vælg den relevante af de to følgende muligheder for at klarlægge pladen.
 - **Mulighed nr. 1:** Hvis prøverne er i en MIDI-plade.
 - a. Markér MIDI-pladen LP2 (Library Preparation 2 – Biblioteksklargøring 2).Hvis nogle prøver er i separate MIDI- plader, skal alle prøver overføres til separate brønde i samme MIDI-plade i henhold til pladelayoutet.
 - **Mulighed nr. 2:** Hvis pladen er frossen.
 - a. Optø PCF PCR-pladen eller LP PCR-pladen til stuetemperatur.
 - b. Centrifuger pladen ved 280 × g i 1 minut.
 - c. Bland 10 gange ved pipettering.
 - d. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP2 (Library Preparation 2 – Biblioteksklargøring 2).
 - e. Overfør alle 50 µl af hver prøve fra PCF PCR -pladen eller LP PCR- pladen til den tilsvarende brønd i LP2 MIDI-pladen.
 - f. Kassér PCF PCR- eller LP PCR-pladen.

Fremgangsmåde

1. Tilføj 10 µl ERA1-masterblanding til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
2. Kassér den resterende ERA1-masterblanding.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
4. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
5. Inkuber i en forvarmet mikroprøveinkubator ved 30 °C i 30 minutter.
6. Overfør straks til en anden, forvarmet mikroinkubator, og inkuber ved 72 °C i 20 minutter.
7. Placer LP2 MIDI-pladen på is i 5 minutter.

Ligering af adaptore

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

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

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

Klargøring

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

Fremgangsmåde

1. Fjern LP2 MIDI-pladen fra is.
2. Tilføj 60 µl ALB1 til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen. Sørg for at pipettere langsomt.
3. Tilføj 5 µl LIG3 til hver prøvebrønd.
4. Tilføj adaptore.
Kombiner *ikke* forskellige typer adaptore sammen.
 - **RNA-prøvebrønde** – 10 µl SUA1 (blå hætte) til hver prøve afledt fra RNA.
 - **DNA-prøvebrønde** – 10 µl UMI (hvid hætte) til hver prøve afledt fra DNA.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Inkuber ved stuetemperatur i 30 minutter.
8. Bland STL på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

9. Tilføj 5 µl STL til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
10. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
11. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.

Oprensning ved ligering

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

Klargøring

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

Reagens	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % ethanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-frit vand	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

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

Fremgangsmåde

Bind

1. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
2. Tilføj straks 112 µl SPB til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,05 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
4. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
5. Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter.
6. Placer LP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder i 10 minutter.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

7. Brug en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Bibehold perlerne på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver prøvebrønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Fjern resterende EtOH fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluer

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

Indeksering af PCR

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

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - EPM – Opbevares på is.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- UPxx – Bland på vortexblander, og centrifugér kortvarigt. UPxx er den indeksprimer, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.
 - CPxx – Bland på vortexblander, og centrifugér kortvarigt. CPxx er den indeksprimer, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.
2. Sørg for, at indekser for hver prøve matcher den kørsel, der blev planlagt i Local Run Manager under kørselskonfigurationen. Sørg for at følge instruktionerne vedrørende valg af indeks i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#).



FORSIGTIG

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

Fremgangsmåde

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



FORSIGTIG

Håndter og åbn kun ét indeksprimerrør ad gangen. Luk hvert indekstrør med en ny hætte umiddelbart efter brug. Kombiner ikke indeksprimere.

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



FORSIGTIG

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

7. Centrifugér LS PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
8. Placer på den forprogrammerede termocykler til anvendelse post amplifikation, og kørsel I-PCR-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 36](#).

BEMÆRK! Hvis du fortsætter med [Konfiguration af første hybridisering på side 56](#), skal du følge instruktionerne til optøning af reagenser i trinnene Klargør protokol.

9. Når I-PCR-programmet er færdigt, skal LS PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut.
10. Markér pladen ALS (Amplified Library Samples – Amplificerede biblioteksprøver).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ALS PCR-pladen opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Klargøring til protokoltrin

1. Sørg for, at termocyklerens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 36](#).
2. Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Konfiguration af første hybridisering

Tabel 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

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

Tabel 22 TruSight Oncology Comp Indhold i kittet, æske (PN 20031122)

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

Konfiguration af første hybridisering

Under denne proces hybridiserer en pulje af oligoer til cDNA-biblioteker, og en pulje af oligoer hybridiserer til gDNA-biblioteker klargjort i [Indeksring af PCR på side 54](#). Berigelse af målrettede regioner kræver to hybridiseringstrin. I den første hybridisering hybridiserer oligoer til cDNA- og/eller gDNA-biblioteker natten over (8 til 24 timer).

Klargøring

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPR1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
2. Hvis ALS PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og centrifugeres ved 280 × g i 1 minut. Bland derefter ved pipettering.
 3. Markér en ny 96-brønds PCR-plade HYB1 (Hybridization 1 – Hybridisering 1).

Fremgangsmåde

1. Overfør 20 µl af hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-pladen til den tilsvarende brønd i HYB1 PCR-pladen.
2. Påfør selvklebende pladeforsegler til ALS PCR-pladen, og sæt den til side.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
3. Inspicer TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
4. Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
5. Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
6. Tilføj prober.
Kombiner *ikke* forskellige typer af prober. Tilføj kun ét probesæt i hver brønd.
 - RNA-biblioteksbrønde – 5 µl OPR1 (rød hætte) til hvert bibliotek afledt fra RNA.
 - DNA TSO Comprehensive (EU)-biblioteksbrønde – 5 µl OPD2 (hvid hætte) til hvert bibliotek afledt fra DNA til TSO Comprehensive (EU)-berigelse.
7. Påfør selvklebende pladeforsegler til HYB1 PCR-pladen.



FORSIGTIG

Sørg for at forsegle kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

8. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
9. Placer på termocykler, og kør HYB1-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 36](#).
10. Hybridiser ved 57 °C i minimum 8 timer og maksimum 24 timer.
11. Sæt hybridiseringsreagenser tilbage til opbevaring.
12. Opbevar ALS PCR-pladen ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Klargøring til protokoltrin

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SMB (mørkeblå mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two
ET2	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two Normalisering af biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets Two Oprensning af amplifieret, beriget bibliotek

Tabel 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

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

Tabel 25 Assay Content Set Box (PN 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPR1 (rød hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPD2 (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering

Indfangning af Targets One

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

Klargøring

1. Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokindsats til 57 °C.
2. Klargør følgende reagenser.
 - EEW – Bland på vortexblander i 1 minut.
 - EE2 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - HP3 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - SMB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - Sørg for at bruge **SMB** og ikke SPB til denne procedure.
 - ET2 – Sæt til side til brug i proceduren.
3. Klargør frisk EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 26 EE2+HP3-elueringsblanding til Indfangning af Targets One

Bestanddel i elueringsblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 29](#) for beregninger.

4. Bland EE2+HP3-elueringsblanding, og centrifugér derefter kortvarigt. Sæt til side til trinnet [Eluer på side 61](#).
5. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP1 (Capture 1 – Indfang 1).
6. Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern HYB1 PCR- pladen fra termocykleren.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

2. Centrifuger HYB1 PCR- pladen ved 280 × g i 1 minut.
3. Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
4. Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SMB er tilføjet til hver prøvebrønd.
5. Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra HYB1 PCR- pladen til den tilsvarende brønd i CAP1 MIDI-pladen.
6. Kassér den tomme HYB1 PCR- plade.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
8. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
9. Inkuber på en forvarmet mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
10. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
11. Mens CAP1 MIDI-pladen bibeholdes på den magnetiske holder, anvendes en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter uden at forstyrre perlepelleten.



FORSIGTIG

Fortsæt straks til det næste trin ([Vask på side 60](#)). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Fjern CAP1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
 - b. Tilføj 200 µl EEW til hver brønd.
 - c. Indstil pipettevolumenet til 150 µl, og bland ved pipettering minimum 10 gange. Sørg for, at alle perler er resuspenderet.



FORSIGTIG

Sørg for, at der ikke er perlepellets til stede ved forsigtigt at opsuge hele brøndens perleopløsning i spidsen. Inspicer herefter bunden af hver brønd for en pellet. Skråstil pipettespidsen mod perlepelleten under vasketrinnene for at løsne pelleten. Sørg for, at perlepelleten er helt opløst. Opløsningen bør være mørkebrun og have en homogen konsistens.

- d. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
- e. Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- f. Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
- g. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- h. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- i. Bibehold på den magnetiske holder, og fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Vask perlerne en *tredje* gang.
4. Fjern resterende supernatant fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.

Eluer

1. Fjern CAP1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Bland frisk EE2+HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
3. Tilføj forsigtigt 17 µl EE2+HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
4. Kassér resterende EE2+HP3-elueringsblanding.
5. Påfør selvklebende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU1 (Elution 1 – Eluering 1).
9. Bland ET2 på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
10. Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU1 PCR-plade.
11. Overfør forsigtigt 15 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU1 PCR-pladen.
12. Kassér den tomme CAP1 MIDI-plade.
13. Påfør selvklebende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
14. Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
15. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
16. Sæt EEW tilbage til opbevaring.

Konfiguration af anden hybridisering

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

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

Fremgangsmåde

1. Inspicer TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
2. Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i ELU1 PCR-pladen.
3. Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd.
4. Tilføj prober.
Kombiner *ikke* forskellige typer af prober.
 - RNA-biblioteksbrønde – 5 µl OPR1 (rød hætte) til hvert bibliotek afledt fra RNA.
 - DNA TSO Comprehensive (EU)-biblioteksbrønde – 5 µl OPD2 (hvid hætte) til hvert bibliotek afledt fra DNA til TSO Comprehensive (EU)-berigelse.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
6. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
7. Placer på termocykler, og kørs HYB2-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 36](#).
8. Hybridiser ved 57 °C i minimum 1,5 og maksimum 4 timer.
9. Sæt hybridiseringsreagenser tilbage til opbevaring.

Indfangning af Targets Two

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

Klargøring

1. Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokindsats til 57 °C.
2. Klargør følgende reagenser.
 - EE2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - HP3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - SMB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- Sørg for at bruge **SMB** og ikke SPB til denne procedure.
 - RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
 - ET2 – Sæt til side til brug i proceduren.
3. Klargør frisk EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 27 EE2+HP3-elueringsblanding til Indfangning af Targets Two

Bestanddel i elueringsblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 29](#) for beregninger.

4. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt. Sæt til side til trinnet [Eluer på side 64](#).
5. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP2 (Capture 2 – Indfang 2).
6. Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern ELU1 PCR-pladen fra termocykleren.
2. Centrifuger ELU1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
3. Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
4. Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SMB er tilføjet til hver prøvebrønd.
5. Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra ELU1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP2 MIDI-pladen.
6. Kassér den tomme ELU1 PCR-plade.
7. Påfør selvklebende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
8. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
9. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.

BEMÆRK! Hvis du fortsætter med [Amplificering af beriget bibliotek på side 65](#), skal du følge instruktionerne for optøning af reagenser i afsnittet Trin til klargøring til protokol.

10. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

11. Bibehold CAP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og brug en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver biblioteksbrønd uden at forstyrre perlepelleten.



FORSIGTIG

Fortsæt straks til det næste trin ([Vask på side 64](#)). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

1. Fjern CAP2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
3. Tilføj 200 µl RSB til hver brønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
6. Placer på den magnetiske holder i 2 minutter.
7. Bibehold CAP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og fjern og kassér alle supernatanter uden at forstyrre perlepelleten.
8. Fjern resterende supernatant fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.

Eluer

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

13. Påfør selvklebende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
14. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
15. Sæt SMB, EE2, HP3 og ET2 tilbage til opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargøring til protokoltrin

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

Tabel 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PPC3	-25°C til -15°C	Optøs til stuetemperatur.	Amplificering af beriget bibliotek
EPM	-25°C til -15°C	Opbevares på is.	Amplificering af beriget bibliotek

Tabel 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

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

Amplificering af beriget bibliotek

Dette trin anvender primere til at amplificere berigede biblioteker.

Klargøring

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

Fremgangsmåde

1. Bland PPC3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
2. Tilføj 5 µl PPC3 til hver biblioteksbrønd i ELU2 PCR-pladen.
3. Bland EPM på vortexblander i 5 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
4. Tilføj 20 µl EPM til hver biblioteksbrønd.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
6. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
7. Placer på en termocykler, og kør EL-PCR-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 36](#).

Bemærk! Hvis du fortsætter med [Normalisering af biblioteker på side 68](#), skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet Trin til klargøring til protokol.

8. Sæt PPC3 og EPM tilbage til opbevaring.

Oprensning af amplificeret, beriget bibliotek

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

Klargøring

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

Figur 4 Klargør frisk 80 % ethanol

Reagens (ml)	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % ethanolalkohol, ren	2	4	8	12	24
RNase/DNase-frit vand	0,5	1	2	3	6

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

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern ELU2 PCR-pladen fra termocykleren.
2. Centrifuger ELU2 PCR-pladen ved $280 \times g$ i 1 minut.
3. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
4. Tilføj straks 110 µl SPB til hver biblioteksbrønd i BIND2 MIDI-pladen.
5. Overfør 50 µl af hvert bibliotek fra ELU2 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND2 MIDI-pladen.
6. Kassér den tomme ELU2 PCR- plade.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
8. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
9. Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter.
10. Placer pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
11. Brug en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere *alle* supernatanter fra hver biblioteksbrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Bibehold perlerne på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Fjern og kassér alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Fjern resterende EtOH fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluer

1. Fjern BIND2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Vend op og ned, eller brug vortexblander for at blande RSB.
3. Tilføj 32 µl RSB til hver biblioteksbrønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
6. Inkuber ved stuetemperatur i 2 minutter.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

7. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade PL (Purified Libraries – Oprensede biblioteker).
9. Overfør 30 µl af hvert eluat fra BIND2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PL PCR-pladen.
10. Kassér den tomme BIND2 MIDI-plade.
11. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen.
12. Sæt SPB tilbage til opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargøring til protokoltrin

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

Tabel 30 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

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

Tabel 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
LNB1	2°C til 8°C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
HP3	2°C til 8°C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker Klargøring til sekventering
LNW1	2°C til 8°C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
LNS1	2°C til 8°C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker

2. Hvis du fortsætter samme dag med [Klargøring til sekventering på side 72](#), skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet Trin til klargøring til protokol.

Normalisering af biblioteker

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

Klargøring

- Klargør følgende reagenser.
 - LNB1 – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - LNA1 – Bland på vortexblander.
 - EE2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - HP3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - LNW1 – Bland på vortexblander. Sæt til side til brug i proceduren.
 - LNS1 – Bland på vortexblander. Sæt til side til brug i proceduren.
- Bland LNB1 på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
Vend LNB1-røret op og ned for at sikre, at alle perlerne er resuspenderet.
- Brug en 800 µl P1000-pipette, pipetter LNB1 op og ned 10 gange for at sikre resuspension.
- Klargør straks frisk LNA1+LNB1-masterblanding i et konisk rør.



FORSIGTIG

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

Tabel 32 LNA1+LNB1-masterblanding

Bestanddel i masterblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 29](#) for beregninger.

- Bland LNA1+LNB1-masterblanding på vortexblander. Sæt til side til trinnet [Bind på side 70](#).
- Klargør frisk EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 33 EE2+HP3-elueringsblanding til normalisering af biblioteker

Bestanddel i elueringsblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 29](#) for beregninger.

- Bland frisk elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side til trinnet [Eluer på side 70](#).
- Hvis PL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs til stuetemperatur, centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut og derefter blandes ved pipettering.
- Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BBN (Bead Based Normalization – Perlebaseret normalisering).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

10. Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Bland LNA1+LNB1-masterblanding på vortexblander.
2. Tilføj straks 45 µl LNA1+LNB1-masterblanding til hvert bibliotek i BBN MIDI-pladen.
3. Kassér den resterende LNA1+LNB1-masterblanding.
4. Tilføj 20 µl af hvert bibliotek fra PL PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BBN MIDI-pladen.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 30 minutter.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen, og sæt den tilbage til opbevaring.
8. Placer pladen på en magnetisk holder i 2 minutter.
9. Bibehold pladen på en magnetisk holder, og brug en P200-pipette til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

1. Vask perlerne som følger.
 - a. Fjern BBN MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
 - b. Tilføj 45 µl LNW1 til hver biblioteksbrønd.
 - c. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
 - d. Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 - e. Omryst ved 1800 o/min. i 5 minutter.
 - f. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
 - g. Fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Fjern resterende supernatant fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.

Eluer

1. Fjern BBN MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Bland frisk EE2+HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Tilføj 32 µl EE2+HP3-opløsning til hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen.
4. Kassér den resterende elueringsblanding.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade NL (Normalized Libraries - Normaliserede biblioteker).
9. Overfør forsigtigt 30 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i NL PCR-pladen.



FORSIGTIG

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

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

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargøring til protokoltrin

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

1. Hent biblioteksfortyndingsbufferen (HT1) fra opbevaringen på -25 °C til -15 °C, optø til stuetemperatur, og placer på is.
2. Følg instruktionerne til klargøring i *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)* for de andre materialer i kittet.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklusser)
3. Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PhiX Internal Control (PhiX)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur. Opbevares på is.	Klargøring til sekventering

Tabel 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Klargøring til sekventering
RSB (lyserød mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Klargøring til sekventering

Klargøring til sekventering

Klargøring

1. Gennemgå retningslinjerne for [Antal biblioteker og valg af indekser på side 31](#).
2. Markér et mikrocentrifugerør dHP3 (diluted HP3 – fortyndet HP3).
3. Markér et mikrocentrifugerør dPhiX (diluted PhiX – fortyndet PhiX).
4. Forvarm en varmeblok til 96 °C til mikrocentrifugerør.
5. Klargør en isspand.

Fortynd og denaturer PhiX-kontrol

1. Bland HP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
2. Kombiner følgende volumener i dHP3-mikrocentrifugerøret.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-frit vand
3. Bland dHP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
4. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
5. Bland PhiX-kontrol på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Kombiner følgende volumener i dPhiX-mikrocentrifugerøret.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX-kontrol
7. Tilføj 10 µl dHP3 til dPhiX-røret.
8. Kassér dHP3-røret.
9. Bland dPhiX-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

10. Inkuber dPhiX ved stuetemperatur i 5 minutter for at denaturere.
11. Bland HT1 på vortexblander.
12. Tilføj straks 980 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til dPhiX.
13. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
14. Placer dPhiX på is indtil klargøring af den anden fortynding.
Den endelige koncentration er 20 pM dPhiX.
15. Sæt PhiX, HP3 og RSB tilbage til opbevaring.

Samling og denaturering af biblioteker for TSO Comprehensive (EU)

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



FORSIGTIG

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

3. Vælg én af de følgende muligheder for at samle, denaturere og fortynde bibliotekerne.
 - **Mulighed nr. 1:** Sekventer biblioteker afledt fra RNA-prøver og DNA-prøver på samme tid. Se [Mulighed nr. 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen på side 73](#).
 - **Mulighed nr. 2:** Sekventer biblioteker afledt fra prøver, der udelukkende indeholder DNA. Se [Mulighed nr. 2: Biblioteker, der udelukkende indeholder DNA på side 74](#).
 - **Mulighed nr. 3:** Sekventer biblioteker afledt fra prøver, der udelukkende indeholder RNA. Se [Mulighed #3: Biblioteker, der kun indeholder RNA på side 75](#).

Mulighed nr. 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen

1. Markér et mikrocentrifugerør PRL (Pooled RNA Libraries – Samlede RNA-biblioteker).
2. Markér et mikrocentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries – Samlede DNA-biblioteker).
3. Overfør 10 µl af hvert normaliserede RNA-bibliotek (cDNA) fra NL-pladen til PRL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
4. Overfør 10 µl af hvert normaliserede DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
5. Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Bland hvert PRL- og PDL-rør på vortexblander.
7. Centrifuger PRL- og PDL-rørene kortvarigt.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

8. Inkuber PRL- og PDL-rørene i en varmeklok ved 96 °C i 2 minutter.
9. Placer PRL og PDL på is i 5 minutter.
10. Bland PRL- og PDL-rørene på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
11. Sæt PRL- og PDL-rørene tilbage på is.

Klargør første fortynding

1. Markér et 1,7 ml mikrocentrifugerør DIL1 (Dilution 1 – Fortynding 1).
2. Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
3. Tilføj 5 µl PRL til DIL1.
4. Kassér PDL- og PRL-rørene.
5. Tilføj 475 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
6. Bland DIL1-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Dilution 2 – Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).
5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument)* (dokumentnr. 1000000009513).
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument)* (dokumentnr. 1000000009513).

Mulighed nr. 2: Biblioteker, der udelukkende indeholder DNA

1. Markér et mikrocentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries – Samlede DNA-biblioteker).
2. Overfør 10 µl af hvert normaliserede DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

3. Tilføj selvklebende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
4. Bland PDL-røret på vortexblander.
5. Centrifuger PDL-røret kortvarigt.
6. Inkuber PDL-røret i en varmekub ved 96 °C i 2 minutter.
7. Placer PDL på is i 5 minutter.
8. Bland PDL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
9. Sæt PDL-røret tilbage på is.

Klargør første fortynding

1. Markér et 1,7 ml mikrocentrifugerør DIL1 (Dilution 1 – Fortynding 1).
2. Overfør 10 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
3. Kassér PDL-røret.
4. Tilføj 190 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
5. Bland DIL1 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Dilution 2 – Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).
5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument)* (dokumentnr. 1000000009513).
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar derefter ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument)* (dokumentnr. 1000000009513).

Mulighed #3: Biblioteker, der kun indeholder RNA

1. Markér et mikrocentrifugerør PRL (Pooled RNA Libraries – Samlede RNA-biblioteker).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

2. Overfør 10 µl af hvert normaliserede RNA-bibliotek (cDNA) fra NL-pladen til PRL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
3. Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
4. Bland PRL-røret på vortexblander.
5. Centrifuger PRL-røret kortvarigt.
6. Inkuber PRL-røret i en varmeklok ved 96 °C i 2 minutter.
7. Placer PRL på is i 5 minutter.
8. Bland PRL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
9. Sæt PRL-røret tilbage på is.

Klargør første fortynding

1. Markér et 1,7 ml mikrocentrifugerør DIL1 (Dilution 1 – Fortynding 1).
2. Overfør 10 µl PRL til det tomme DIL1-rør.
3. Kassér PRL-røret.
4. Tilføj 190 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
5. Bland DIL1 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Dilution 2 – Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1646 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:843).
5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Tilføj 16,7 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument) (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument) (dokumentnr. 1000000009513)*.

Tolkning af resultater

Sekventeringsresultaterne fra TSO Comprehensive (EU)-analysen rapporteres individuelt for hver prøve i en PDF- rapport og en JSON-rapport. Derudover genereres en rapport om lav dybde (`LowDepthReport.tsv`) på prøveniveauet. På kørselsniveauet genereres følgende outputfiler:

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

Kun variationer, der består kvalitetskontrollen, vises i de endelige PDF- og JSON-rapporter.

Se *Vejledningen til arbejdsgangen i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module* (dokumentnr. 200008661) for detaljerede oplysninger om analysen.

Resultater af ledsagende diagnosticering

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

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

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

Tumorprofileringsvariationer

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Til tumorprofileringsvariationer klassificeres positive resultater i Genomfund med evidens for klinisk signifikans eller Genomfund med potentiel klinisk signifikans i henhold til den installerede videnbase og den identificerede tumortype.

Fejl i kvalitetskontrol medfører ingen resultater for de typer af variationer, der er relevante for den mislykkede kvalitetskontrolmåling. Se [TSO Comprehensive \(EU\)-rapport, resultat af kvalitetskontrolmålinger på side 78](#) og [TSO Comprehensive \(EU\)-rapport, resultat af kontrolmålinger på side 83](#) for flere oplysninger.

Tumorprofileringsvariationer med utilstrækkelig dybde er anført i rapporten om lav dybde og ikke i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Kvalitetskontrol

- Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23](#) for at få mere at vide om kvantificering af nukleinsyre og minimumkrav til inputmateriale.
- Sekventeringskørsel og prøvevaliditet bestemmes automatisk og rapporteres af TSO Comprehensive (EU) Analysis Module. Softwaren genererer en `MetricsOutput.tsv`-fil (omfatter QC-resultater for kørsel, DNA-bibliotek og RNA-bibliotek) og en `ControlOutput.tsv`-fil (omfatter resultater for kontroller), der rapporterer følgende målinger og specifikationer:

Tabel 36 TSO Comprehensive (EU)-rapport, resultat af kvalitetskontrolmålinger

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
Sekventeringskørsel	PCT_PF_READS (PCT_PF_LÆSNINGER) (%)	≥ 80,0	Procentdelen af læsninger, der passerede filteret (PF).	Sekventeringskørsel ugyldiggjort, ingen resultater rapporteret for nogen prøve i kørslen.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Gennemsnitlig procentdel af basebestemmelser med en kvalitetsscore på Q30 eller højere for læsning 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80 %	Gennemsnitlig procentdel af basebestemmelser med en kvalitetsscore på Q30 eller højere for læsning 2.	

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
DNA-biblioteker	CONTAMINATION_SCORE (KONTAMINERING-SSCORE)	≤ 3106 ELLER > 3106 og P_VALUE (P-VÆRDI) ≤ 0,049	En måling, der vurderer sandsynligheden for kontaminering ved hjælp af variations-allelfrekvensen (VAF) for almindelige variationer. Kontamineringsscoren baseret på distribution af variations-allelfrekvens (VAF) for SNP'er. P-værdien for kontaminering anvendt til vurdering af højt omarrangerede genomer; kun relevant, hvis kontamineringsscoren er over den øvre specifikationsgrænse.	Ingen DNA-resultater rapporteret.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (MEDIAN_INSERT_STØRRELSE) (bp)	≥ 70	Den mediane fragmentlængde i prøven.	Ingen resultater rapporteret for TMB eller små DNA-variationer.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (MEDIAN_EXONDÆKNING) (antal)	≥ 150	Median exonfragmentdækning på tværs af alle exonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Procentdelen af exonbaser med 50X fragmentdækning.	

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
	USABLE_MSI_SITES (BRUGBARE_MSI_STEDER) (antal)	≥ 40	Antallet af MSI-steder, der er brugbare til MSI-bestemmelse (antallet af mikrosatellit-steder, der spænder over tilstrækkelige læsninger til at identificere mikrosatellit-instabilitet).	Ingen MSI-resultater rapporteret.
	COVERAGE_MAD (DÆKNING_MAD) (antal)	$\leq 0,210$	Medianen for absolutte afvigelser fra medianen af den normaliserede tælling for hvert CNV-målområde.	Ingen resultater rapporteret for genamplifikation.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNVTARGET (MEDIAN_BIN_TÆLLING_CNVMÅL) (antal)	$\geq 1,0$	Median rå bin-tælling pr. CNV-mål.	

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
RNA-biblioteker	MEDIAN_INSERT_SIZE (MEDIAN_INSERT_STØRRELSE) (bp)	≥ 80,0	Den mediane fragmentlængde i prøven.	Ingen resultater rapporteret for fusioner eller splejsningsvariationer.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (MEDIAN_CV_GENE_500X) (koefficient)	≥ 93.0	MEDIAN_CV_GENE_500X (Median_CV_GENE_500X) er en måling af ensartetheden af dækning. For hvert gen med mindst 500x dækning bliver variationskoefficienten for dækning på tværs af genet beregnet. Denne måling er medianen af disse værdier. En høj værdi angiver et højt variationsniveau og er tegn på et problem i forbindelse med biblioteksklargøringen, såsom lavt prøveinput og/eller problemer med pull-down af prober. Denne måling beregnes ved hjælp af alle læsninger (inklusive læsninger, der er markeret som duplikater).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (TOTAL_LÆSNINGER_PÅ_MÅL) (antal)	$\geq 9.000.000$	Det totale antal læsninger, der bliver kortlagt mod målregionerne. Denne måling beregnes ved hjælp af alle læsninger (inklusive læsninger, der er markeret som duplikater).	

*Vellykkede resultater indikeres med PASS (VELLYKKET)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 37 TSO Comprehensive (EU)-rapport, resultat af kontrolmålinger

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

*Vellykkede resultater indikeres med PASS (VELLYKKET)

- TSO Comprehensive (EU)-rapporten, der er tilgængelig i PDF- og JSON-formater, opsummerer følgende for kvalitetskontrol. Rapporterne findes i analysemappen. Se Vejledning til arbejdsgangen i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661) for placering af analysemappen (indeholder PDF- og JSON-rapporter) og kørselsmappen.
- Gentag sekventeringskørsler, der er ugyldige.
- Gentag tests af biblioteker med følgende resultater:
 - Kontaminerede DNA-biblioteker
 - Ugyldige RNA-biblioteker
 - Tests kan gentages for at opnå flere resultater for variationer eller biomarkører for DNA-biblioteker, der blev ugyldiggjort for én men ikke alle variationstyper.
- Positive kontroller evalueres for variationsbestemmelse. Hvis positive kontroller ikke opfylder kriterierne for variationsbestemmelse, skal sekventeringskørslen ugyldiggøres manuelt. Analysemodulets software ugyldiggør ikke automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver.
- NTC'er evalueres imod median exondækningen for DNA og gener over median skæringsværdi for RNA. Hvis negative kontroller ikke opfylder specifikationerne, skal klargøring af bibliotek og alle tilknyttede sekventeringskørsler ugyldiggøres manuelt. Analysemodulets software ugyldiggør ikke automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver.
- Foretag yderligere kvalitetskontrolmålinger i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale regulativer eller akkrediteringskrav.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Se [Fejlfinding på side 85](#) for at få mere at vide om gentagelse af sekvenskørsler eller test af biblioteker.

Fejlfinding

Brug følgende tabel til fejlfinding af problemer i arbejdsgangen. Hvis en sekventeringskørsel eller klargøring af bibliotek mislykkes to gange, kan der være behov for yderligere fejlfinding. Kontakt Illuminas tekniske support.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Sekventeringskørslen lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol af kørslen	Fejl i anvendelse eller laboratorieudstyr under analysearbejdsgangen	Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illuminas tekniske support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. • Sekventer bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargøring til sekventering på side 72. • Berig bibliotekerne fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfiguration af første hybridisering på side 56. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Denaturering og annealering af RNA på side 43 eller Fragmentering af gDNA på side 47.
	Problem med instrumentet	Kontakt Illuminas tekniske support.
Fejl under generering af rapport eller generel fejl med sekventeringsmaskinen (f.eks. netværksfejl, fejl under tilføjelse/fjernelse af reagenser osv.)	Software- eller instrumentfejl	Se <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang</i> (dokumentnr. 200008661) for hjælp til generering af rapporter, eller se <i>Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet</i> (dokumentnr. 1000000009513). Kontakt Illuminas tekniske support for yderligere hjælp.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
DNA-biblioteket lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol	Krav til prøveinput blev ikke overholdt	Sørg for relevant prøveinput, og gentag klargøring af bibliotek fra trinnet Fragmentering af gDNA. Se Krav til væv på side 22 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23 .
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen	Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illuminas tekniske support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. • Sekventer bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargøring til sekventering på side 72. • Berig bibliotekerne fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfiguration af første hybridisering på side 56. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Fragmentering af gDNA på side 47.
	Kriterier for KONTAMINERINGSSCORE, KONTAMINERING_P_VÆRDI er ikke overholdt	Se Advarsler og forsigtighedsregler for oplysninger om, hvordan du undgår krydskontaminering. Gennemgå pladelayout og biblioteksindeksering for at sikre, at biblioteker med samme indeks ikke blev sekventeret sammen. For de biblioteker, der er påvirket, skal du starte klargøring af bibliotek fra arbejdsgangens begyndelse. Se Fragmentering af gDNA på side 47 . Kontaminering kan være opstået under ekstraktion af prøven. Det kan være nødvendigt at gentage ekstraktion for at sikre, at prøven ikke er kontamineret.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
	Brugbart MSI mislykkedes	Gennemgå producenten af ultrasonikatorens indstillinger for brug og drift (herunder vandniveau og rørtype). Sørg for det korrekte prøveinput i analysen. Se Krav til væv på side 22 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23. Det kan være nødvendigt at ekstrahere en ny prøve eller gentage trinnet Fragmentering af gDNA, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.
DNA-biblioteket lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol	Prøven kan være overfragmenteret, eller nukleinsyren kan være beskadiget, hvilket påvirker evnen til at generere tilstrækkelige unikke biblioteker	Gennemgå producenten af ultrasonikatorens indstillinger for brug og drift (herunder vandniveau og rørtype). Sørg for det korrekte prøveinput i analysen. Se Krav til væv på side 22 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23. Det kan være nødvendigt at ekstrahere en ny prøve eller gentage trinnet Fragmentering af gDNA, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
RNA-biblioteket levede ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol	Krav til prøveinput blev ikke overholdt	Sørg for korrekt prøveinput, og gentag klargøring af bibliotek fra trinnet Denaturering og annealering af RNA. Se Krav til væv på side 22 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23 .
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen	Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illuminas tekniske support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. • Sekventer bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargøring til sekventering på side 72. • Berig bibliotekerne fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfiguration af første hybridisering på side 56. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Denaturering og annealering af RNA på side 43.
	Prøven kan være overfragmenteret, eller nukleinsyren kan være beskadiget, hvilket påvirker evnen til at generere tilstrækkelige unikke biblioteker	Sørg for det korrekte prøveinput. Se Krav til væv på side 22 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 23 . Det kan være nødvendigt at ekstrahere prøven igen, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Fejl i positiv kontrol (DNA/RNA)	Krav til prøveinput for den positive kontrol blev ikke overholdt.	Sørg for korrekt input i analysen. Gennemgå pladelayout, og sørg for, at korrekte reagenser (prober, indekser) er i korrekte brønde. Sørg for, at den positive kontrol opbevares i henhold til mærkaten. For alle prøver, der deler den positive kontrol, gentages klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illuminas tekniske support for hjælp til fejlfinding af din kørsel.
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen.	• Sekventer bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargøring til sekventering på side 72. • Berig bibliotekerne fra PCR-pladen med de amplificerede biblioteksprøver (ALS). Se Konfiguration af første hybridisering på side 56. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Denaturering og annealering af RNA på side 43 eller Fragmentering af gDNA på side 47.
NTC-fejl (DNA/RNA)	Krydskontaminering opstod, eller arbejdsområdet er kontamineret	Se afsnittet Advarsler og forsigtighedsregler for oplysninger om dekontaminering af arbejdsområdet. Se Advarsler og forsigtighedsregler for oplysninger om, hvordan du undgår krydskontaminering. Gennemgå pladelayout og biblioteksindeksering for at sikre, at biblioteker med samme indeks ikke blev sekventeret sammen. Gentag klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen for alle biblioteker, der deler ingen skabelonkontrol.
	Forkert indeksering af bibliotek	
Softwaren indikerer, at positive og/eller negative kontroller ikke var inkluderet i sekvenskørslen	Forkert tildeling af tumortype i planlægningen af Local Run Manager-kørslen	Sæt analyse i kø igen med kontroller korrekt identificeret i henhold til instruktionerne i Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661).

Ydelsesegenskaber

TSO Comprehensive (EU) er et målrettet NGS-panel med 517 gener. Små DNA-varianter – enkelt-nukleotidvarianter (SNV'er), multinukleotidvarianter (MNV'er), insertioner og deletioner – er egnede til rapportering fra alle 517 gener. Genamplifikation er egnede til rapportering fra MET- og ERBB2-gener. Fusioner er egnede til rapportering fra 23 af de gener, der er indikeret i [TSO Comprehensive \(EU\)-analysepanel på side 2](#). Splejsningsvarianter er egnede til rapportering fra MET- og EGFR-generne. For at blive rapporteret skal varianter skal detekteres og have evidens i TSO Comprehensive (EU)-analysens vidensbase og være egnede baseret på den vævstype, der testes. For at kunne rapporteres kræver NTRK-fusioner, at fusionspartneren er 5' og NTRK-kinasedomænet er intakt.

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

[Tabel 38](#) angiver definitioner på målinger beregnet i forskellige studier.

Tabel 38 Definitioner på målinger

Term	Definition
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA)	Procentdelen af positive korrekt identificeret fra det samlede antal positive i forhold til en ortogonal metode.
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA)	Procentdelen af negative korrekt identificeret fra det samlede antal negative i forhold til en ortogonal metode.
Positiv procentvis konkordans (PPC)	Procentdelen af positive bestemmelser korrekt identificeret fra det samlede antal positive i forhold til en kontrolbetingelse i en direkte, parvis sammenligning.
Negativ procentvis konkordans (NPC)	Procentdelen af negative bestemmelser korrekt identificeret fra det samlede antal negative i forhold til en kontrolbetingelse i en direkte, parvis sammenligning.
Positiv procentvis bestemmelse (PPC)	Procentdelen af observationer, der er positive for et mål blandt observationer, der forventes at være positive for målet.
Negativ procentvis bestemmelse (NPC)	Procentdelen af observationer, der er negative for et mål blandt observationer, der forventes at være negative for målet.
Samlet procentoverensstemmelse (OPA)	Procentdelen af positive og negative korrekt identificeret fra det samlede antal observationer i forhold til en ortogonal metode.

Krydskontaminering

Krydskontamineringsstudiet blev udført for at evaluere, om falsk-positiv-resultater som følge af brønd-til-brønd-kontaminering under klargøring af prøvebibliotek samt kørsel-til-kørsel-kontaminering mellem konsekutive sekventeringskørsler opstår for TSO Comprehensive (EU)-analysen. To DNA- og to RNA-prøver med unikke og ikke-overlappende variationer blev anvendt til at evaluere krydskontaminering. 32 DNA-biblioteker og 32 RNA-biblioteker blev hver klargjort tre gange af to operatører i et checkboard-layout med skiftende prøver for at evaluere brønd-til-brønd-kontaminering og med skiftende indekser for at evaluere kontaminering mellem sekvenskørsler ved konsekutiv sekventering på det samme NextSeq 550Dx-instrument. For at evaluere krydskontaminering blev små DNA-variationer (der også påvirker TMB) og RNA-variationer evalueret (MSI og genamplifikationer blev ikke evalueret). Krydskontamineringsstudiet viste ingen kontamineringshændelser ved undersøgelse af de detekterede variationer i hver prøve, og der blev ikke observeret falske positiver.

Evaluering af kit til nukleinsyreekstraktion

Tre kommercielt tilgængelige kit til ekstraktion af DNA og RNA blev evalueret med TSO Comprehensive (EU). De tre kits til ekstraktion isolerede både RNA og DNA fra de samme sektioner af FFPE-væv. Kittene anvendte forskellige afparaffineringsmidler og trin til nukleinsyrebinding ([Tabel 39](#)). Kit 1 er det kit, der oftest bruges til at fastslå ydeevnen for TSO Comprehensive (EU).

Tabel 39 Kittets karakteristika

Kit	Afparaffineringsmiddel	Nukleinsyrebinding
1	Ophavsretligt beskyttet	Kolonne
2	Xylen	Kolonne
3	Mineralsk olie	Magnetiske perler

Syv prøver (5 FFPE-væv og 2 FFPE-cellelinjer) blev ekstraheret dobbelt af 2 operatører, gentaget over tre dage for hvert af de tre ekstraktionskits (7 prøver x 3 ekstraktionskits x 2 operatører til ekstraktion x 3 dages ekstraktion x 2 ekstraktionsreplikater).

I [Tabel 40](#) opsummeres de indvirkninger, ekstraktionskits har på validiteten af et bibliotek og variationsbestemmelse. For validiteten af et bibliotek blev den største rate-differens mellem ekstraktionskits rapporteret, og signifikans blev bestemt, ved hjælp af en kvantitativ analyse af målingerne. Med hensyn til variationsbestemmelse blev forskellen rapporteret, hvis ekstraktionskittets middelværdi afveg signifikant.

Det blev observeret, at ekstraktionskits påvirker målinger af validiteten af et bibliotek for små DNA-variationer/TMB og MSI. Målinger af bibliotekets validitet for genamplifikationer og RNA afveg ikke signifikant mellem ekstraktionskits. Ekstraktionskits påvirkede ikke variationsbestemmelse for små DNA-variationer og TMB-score. For MSI-score og genamplifikationer blev der ikke detekteret nogen falske positiver, og ved en kvantitativ analyse blev der ikke fundet signifikante afvigelser i de negative prøver. Det blev observeret, at ekstraktionskits havde forskellige værdier for understøttende læsninger, således at fusions- og splejningsvariationer nær LoD muligvis blev overset som følge af valg af ekstraktionskit.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Det valgte ekstraktionskit skal anvendes i laboratoriets verificering af karakteristika for ydeevne for TSO Comprehensive (EU) og til at give tilstrækkelig validitet af biblioteket.

Tabel 40 Ekstraktionskittets indvirkning på validiteten af et bibliotek og variationsbestemmelse

Variationstype	Validitetsrate for bibliotek (Største forskel)	Variantbestemmelse (Største gennemsnitlige forskel i underliggende variabel)
Små DNA-varianter	Kit 2 signifikant lavere end kit 3 (10 %)	Ikke signifikant
TMB		Ikke signifikant
MSI	Kit 1 signifikant lavere end kit 3 (14 %)	Ingen falske positive detekteret Falske negative blev ikke evalueret
Genamplifikation	Ikke signifikant (5 %)	Ingen falske positive detekteret Falske negative blev ikke evalueret
Fusioner	Ikke signifikant (3 %)	Kit 1 signifikant lavere end kit 3 (11 %)
Splejsningsvarianter		Kit 1 signifikant lavere end kit 3 (11 %)

Interfererende stoffer

Påvirkningen af potentielle endogene og eksogene stoffer på TSO Comprehensive (EU)-analysens ydeevne blev evalueret på 16 unikke FFPE-prøver fra hjerne, skjoldbruskkirtel, tyktarm, bryst, lunger, prostata, hud og typer af blødt væv. Prøverne blev opspædet med endogene stoffer, melanin og hæmoglobin under processen med ekstraktion af nukleinsyre. Eksogene stoffer (ethanol, xylene og Proteinase K) var til stede under processen med ekstraktion af nukleinsyre, men blev også spædet til den oprensede nukleinsyre inden klargøring af bibliotek. Tilføjelse af ekstra Proteinase K under ekstraktionsprocessen blev også vurderet, hvor interferens blev observeret med opspædet Proteinase K. Der var en ikke-opspædet, endogen kontrol og buffer eller endogen kontrol opspædet med vand for hver af de 16 unikke prøver. Effekten af nekrose blev vurderet på et andet sæt af otte FFPE-prøver af væv fra lunger, hjerne og tyktarm. Der var en makrodissekeret kontrol uden nekrose for hver nekroseprøve. For alle forstyrrelser blev fire replikater pr. prøve pr. stof testet ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med deres respektive kontroller for detektering af små DNA-varianter, genamplifikationer, RNA-amplifikationer, RNA-fusioner og RNA-splejsningsvarianter samt for MSI-status og TMB-score.

Detektering af DNA-varianter

Melanin (0,2 µg/ml), hæmoglobin (2 mg/ml), ethanol (5 %), Proteinase K (0,04 mg/ml) og xylene (0,0001 %) interfererer ikke med TMB-score, MSI-status, små DNA-varianter og genamplifikationer.

Detektering af RNA-variation

Dataene understøtter, at hæmoglobin (2 mg/ml), melanin (0,2 µg/ml), ethanol (5 %) og xylen (0,0001 %) ikke interfererer med RNA-fusioner eller splejsningsvariationer. Ligeledes var der ingen interferens på detektering af RNA-variation ved opspædning af 0,02 mg/ml Proteinase K i RNA inden klargøring af bibliotek og ved opspædning af op til 2,6 mg/ml Proteinase K til prøven under processen med oprensning af RNA.

Der blev observeret nogle falske positive i forhold til kontroller uden interferens mellem replikater af biblioteker for RNA-fusioner med hæmoglobin, melanin, ethanol og xylen og for RNA-splejsningsvariationer med melanin og xylen. Ligeledes blev der observeret nogle falske negative på visse replikater af biblioteker for RNA-splejsningsvariationer med hæmoglobin, melanin, xylen og 0,02 mg/ml Proteinase K. I alle tilfælde blev de falske positive og falske negative imidlertid vurderet som prøvevæv, idet observationer for detekterede hændelser viste understøttende læsninger nær LoD. Falske positive og falske negative blev derfor vurderet som ubeslægtede for interferens og blev tilskrevet vilkårlig variation i antallet af understøttende læsninger for fusions- og/eller splejsningsvariationer ved eller under LoD.

Nekrose

Tilstedeværelsen af nekrotisk væv op til 70 % interfererer ikke med detektering af TMB-score, MSI-status, små DNA-variationer eller RNA-splejsningsvariationer. Detektering af RNA-fusioner og genamplifikationer er påvirket i prøver med ≥ 25 % nekroseindhold i vævsområdet. Hvis prøvesektionen indeholder mere end 25 % nekrose i det samlede vævsområde, skal det nekrotiske væv makrodissekteres.

Stabilitet

Realtidsstabilitet

Realtidsstabilitet blev anvendt til at fastslå holdbarhedsperioden for TSO Comprehensive (EU)-analysekittet ved opbevaring i henhold til betingelserne på mærkaten. Studiedesignet var baseret på testning af 3 reagenspartier og brugte de klassiske stabilitetsstudiedesign, som er beskrevet i CLSI EP25-A. Kittene blev opbevaret i endelig kitkonfiguration under hele studiet ved de opbevaringsforhold, der var defineret på produktetiketten. Frosne kitkomponenter blev opbevaret ved -15 °C til -25 °C. Kølede kitkomponenter blev opbevaret ved 2 °C til 8 °C. Kitkomponenter ved stuetemperatur blev opbevaret ved 15 °C til 30 °C. Kits blev testet for udseende og funktionelle kriterier for kitfrigivelse på specifikke tidspunkter. Derudover blev variationsbestemmelse og tendenser for kvalitetskontrolmålinger af prøven analyseret for kontrolmateriale til kvalitetskontrol. Holdbarhedsperioden blev bestemt for hver reagens. Udløbsdatoer tildeles baseret på produktionsdato og holdbarhedsperiode. Kittets udløbsdato tildeles baseret på den reagens, der udløber først.

Kittets stabilitet under brug

TSO Comprehensive (EU)-analysekittets stabilitet under brug blev evalueret under forhold med standardbrug gennem holdbarhedsperioden for at understøtte anvendelse af flere kit. Reagenskittet blev frosset ned/tøet op gentagne gange og testet for at understøtte op til 4 brug af kittet. Derudover blev 8 RNA- og 8 DNA-biblioteker

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

klargjort i alt 3 gange for at teste det maksimale antal understøttede biblioteker (24 DNA- og 24 RNA-biblioteker pr. kit). Alle kriterier for funktionel frigivelse blev opfyldt for alle nedfrysings-/optøningscyklusser og testede tidspunkter.

Test af FFPE-prøver med reagenser ≥ 25 måneder blev udført for at vurdere indvirkningen af test under brug på variationsbestemmelse. En kvalitativ analyse af målrettede variationer påviser, at hændelser under brug ikke påvirkede variationsbestemmelse.

Biblioteksstabilitet

Stabiliteten af biblioteker klargjort ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev evalueret ved hjælp af 8 FFPE DNA- og 8 FFPE RNA-prøver fra 9 forskellige vævstyper testet tre gange gennem analysen. Bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) blev samlet og sekventeret på dag 0. Det resterende volumen af bibliotekerne i NL PCR-pladen blev opbevaret på frost (-25°C til -15°C) og derefter samles igen og sekventeret på dag 30. Alle statistisk væsentlige resultater fra små DNA-varianter mellem dag 0 og dag 30 var teknisk ubetydelige. Der var ingen statistiske forskelle mellem resultaterne for dag 0 og dag 30 for MSI-status, TMB-score, genamplifikationer, RNA-fusioner og RNA-splejsningsvariationer. Dataene indikerer, at biblioteker genereret fra TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i op til 30 dage ved -25°C til -15°C .

Stabiliteten af FFPE- væv på objektglas

Stabiliteten af FFPE-væv på objektglas til brug med TSO Comprehensive (EU)-analysen blev evalueret ved at opdele FFPE-blokke i sektioner (sektioner på $5\text{ }\mu\text{m}$) fra 16 unikke prøver, der repræsenterer ni vævstyper, overføre disse til objektglas og efterfølgende opbevare dem ved stuetemperatur på 3 forskellige tidspunkter: 1 dag (kontrol), 4 uger og 8 uger. Nukleinsyrer (både DNA og RNA) blev ekstraheret på de angivne tidspunkter og derefter opbevaret frosset, indtil ekstraktion for alle tidspunkter var gennemført. Ekstraheret RNA blev opbevaret ved -65°C til -85°C , og ekstraheret DNA blev opbevaret ved -15°C to -25°C . For tidspunkt blev tre replikater pr. prøve testet ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med kontrollen for små DNA-varianter, MSI-status, TMB-score, genamplifikationer, RNA-amplifikationer, RNA-fusioner og RNA-splejsningsvariationer. Dataene indikerer, at FFPE-væv på objektglas til brug med TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabilt i op til 4 uger.

Sikkerheden for titreringsinput af nukleinsyre

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

- MEDIAN_INSERT_SIZE (MEDIAN_INSERT_STØRRELSE) reagerede ikke på input over 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE (MEDIAN_EXONDÆKNING) udviste en lineær korrelation med stigningen af inputmængden.
- PCT_EXON_50X steg med et øget input op til 80 ng.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

- `USABLE_MSI_SITES (BRUGBARE_MSI_STEDER)` steg med et øget input. Visse prøver med færre end 40 `USABLE_MSI_SITES (BRUGBARE_MSI_STEDER)` ved 40 ng opfyldte specifikationen ved højere input, hvilket muliggør beregning af en MSI-score.
- `MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (MEDIAN_BIN_TÆLLING_CNV_MÅL)` steg med øget input.
- Øget input for at øge `COVERAGE_MAD (DÆKNING_MAD)` mod den øvre specifikationsgrænse.

Kvalitetsmålinger af RNA-prøver øgede (`MEDIAN_INSERT_SIZE (MEDIAN_INSERT_STØRRELSE)` og `TOTAL_ON_TARGET_READS (TOTAL_LÆSNINGER_PÅ_MÅL)`) eller reducerede (`MEDIAN_CV_GENE_500X (MEDIAN_CV_GEN_500X)`) fra 10 ng til 40 ng, men ændredes generelt ikke ved et input mellem 40 ng og 85 ng.

Blindgrænse

Procentdel af falsk positive (ud af de samlede, forventede negative) blev evalueret med replikattestning af FFPE normalt eller godartet, tilstødende væv, der ikke må indeholde somatiske variationer af små DNA-variationer, genamplifikationer, MSI, RNA-fusioner og RNA-splejsningsvariationer. Falsk positive blev ikke analyseret for TMB, da der ikke er nogen klinisk grænseværdi. Seks DNA- og 6 RNA FFPE-prøver blev kørt dobbelt med 2 operatører over 3 dage for hver af de 2 reagenspartier. Et undersæt af prøver blev samlet i en ny pulje og sekventeret igen i et 3x udelukkende DNA- og et 3x udelukkende RNA-format for at evaluere falske positive med flere multipleks-konfigurationer understøttet af denne enhed. Derudover blev 30 yderligere RNA-prøver kørt dobbelt, behandlet med 1 reagensparti og opdelt mellem 2 operatører. I alt var der 168 mulige observationer for DNA og 228 observationer for RNA reduceret med ugyldige biblioteker for hver variationstype. Procentdelen af falsk positive resultater blev beregnet på genniveau for amplifikationer og på positivt niveau (ca. 1,9 millioner positioner) for små DNA-variationer. Procentdelen af falsk positive resultater for DNA-varianttyper er vist i [Tabel 41](#). Procentdelen af falsk positive resultater for RNA-fusioner og splejsningsvariationer var 0 % som vist i [Tabel 42](#).

Tabel 41 Falsk positive efter DNA-variationstype

Variationstype	Falsk positive
Genamplifikationer	0 % (0/9912)
Små DNA-variationer	0,0001 % (271/295,801,567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	I/R*

*Falsk positive er ikke relevant, da TMB rapporteres som en score, og ikke har kvalitativt udfald.

Tabel 42 Falsk positive efter RNA-variationstype

Variationstype	Falsk positive
Fusion	0 % (0/226)
Splejsningsvariation	0 % (0/226)

Detektionsgrænse

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

Studie 1

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

For DNA-variationer blev de 2 partier analyseret uafhængigt ved hjælp af probit-regression eller hitrate-metoden (laveste testniveau med en hitrate (punktestimat) $\geq 95\%$) for at bestemme LoD for hver variation efter parti. Den største LoD på tværs af de to reagenspartier blev taget som detekteringsgrænsen for variationen (Tabel 43).

For RNA-fusioner blev FFPE-cellelinjer anvendt til at estimere LoD-værdierne for hvert fusionsgen. LoD'erne blev herefter verificeret med FFPE-væv ved hjælp af dobbelte klargøringer af biblioteker på tværs af 3 operatører, 3 instrumenter og 3 partier for at generere 54 observationer pr. variation i nærheden af den LoD, der blev etableret med FFPE-cellelinjer. De krævede detektionsgrænser for hver fusion (Tabel 44) er de lavest gennemsnitlige understøttende læsninger, der nåede en hitrate (punktestimat) $\geq 95\%$.

Tabel 43 Detektionsgrænse for NTRK1, NTRK3 og RET små DNA-variationer

Markør	Kromosom	Position	Reference	Alternativ	Detektionsgrænse (Variationsallelfrekvens)
NTRK1 G595R (SNV)*	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV)*	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV)*	Chr15	88476265	C	T	0,036

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Markør	Kromosom	Position	Reference	Alternativ	Detektionsgrænse (Variationsallelfrekvens)
NTRK3 G696A (SNV)*	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_ E901del (deletion)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

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

Tabel 44 Detektionsgrænse for NTRK- og RET-fusioner

Gen	Fusion	Detektionsgrænse (Understøttende læsninger)
NTRK1	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	ETV6-NTRK2	20,3
	STRN-NTRK2	13,6
NTRK3	ETV6-NTRK3	16,2
	KANK1-NTRK3	13,5
RET	NCOA4-RET	15,8
	CCDC6-RET	18,7
	KIF5B-RET	16,6

Studie 2

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

DNA-variationer

LoD'er for 10 små DNA-variationsklasser (25 variationer i alt) og 2 DNA-genamplifikationer (ERBB2 og MET) blev bestemt og opsummeret som intervaller ([Tabel 45](#)). RET-variationer fra det andet studie af detektionsgrænse blev ligeledes inkluderet. To ud af tre insertioner, som er større end 5 bp havde LoD'er på 0,034 og 0,036, hvor en tredjedel havde en LoD på 0,215. Sidstnævnte var en insertion i en region med lav kompleksitet, hvor insertionen tilføjer yderligere gentagelser, påvirker alignment og kræver flere aflæsninger for ensartet detektion. Visse genomiske kontekster med lav kompleksitet kan derfor påvirke detektering af insertioner >5 bp.

Tabel 45 Detektionsgrænse for små DNA-variationer og genamplifikationer

Type (måleenhed for LoD)	Variationsklasse/genomisk kontekst	Antal variationer	Interval
Små DNA-variationer (variationsallelfrekvens)	SNV'er	5	0,016-0,064
	MNV'er	3	0,022-0,048
	Insertion (1-2 bp) nær homopolymergentagelser	2	0,086-0,104
	Insertion (1-2 bp) nær dinukleotidgentagelser	2	0,038-0,051
	Insertion (3-5 bp)	2	0,030-0,056
	Insertion (> 5 bp og op til 25 bp)	3	0,034-0,215
	Deletion (1-2 bp) nær homopolymergentagelser	2	0,094-0,100
	Deletion (1-2 bp) nær dinukleotidgentagelser	2	0,033-0,070
	Deletion (3-5 bp)	2	0,028-0,064
	Deletion (> 5 og op til 25 bp)	2	0,047-0,055
Genamplifikationer (foldændring)	Efter gen (ERBB2, MET)	2	2,034-2,195

Fusioner

LoD'er blev bestemt for 18 fusioner, der udgjorde 20 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet, varierende fra 10 til 54,7 understøttende læsninger ([Tabel 46](#)). Yderligere 3 gener (NTRK1-3) blev testet i den anden undersøgelse af LoD. Der blev testet for RET-genet her og i den anden undersøgelse af LoD. 16 fusioner med

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

fastslåede LoD'er havde data, der var i overensstemmelse med en generel LoD for 16 understøttende læsninger ved hjælp af en dobbeltsidet, 95 % øvre pålidelighedsgrænse (UCL). To fusioner havde LoD'er på 24,7 og 44,2 understøttede læsninger, der ikke var i overensstemmelse med den generelle LoD.

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

Fusionen BCL2-IGHJ5 med en LoD på 42,2 understøttede læsninger havde et meget kort gen (IGHJ5) med brudpunktet nær starten af en exon, der kræver alignment med introduktion af korte huller. Flere læsninger var således påkrævet for konsekvent detektering.

Tabel 46 Detektionsgrænse for fusioner

Fusion	Gen A, brudpunkt	Gen B, brudpunkt	LoD	Generel LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	10	ja
TMPRSS2-ERG	39817543	42880007	13,2	ja
KIF5B-RET	32311775	43612032	14,5	ja
ACPP-ETV1	132036419	14028762	17,2	ja
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ja
EML4-ALK	29446394	42553391	20,2	ja
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ja
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	24	ja
ESR1-CCDC170	151857451	152023138	24,3	ja
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nej
HNRNPUL1-AXL	41743847	41782201	26,3	ja
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	28,2	ja
SPIDR-NRG1	32453345	48353103	28,2	ja
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	28,5	ja
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	30,5	ja
MKRN1-BRAF	140487383	140158806	31,2	ja
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	44,2	nej
PAX3-FOXO1	41134997	223084859	54,7	ja

Splejsningsvariationer

De 2 RNA-splejsningsvariationer – MET og EGFR – havde LoD'er på henholdsvis 18,7 og 24,8.

Tumorindhold

Resultaterne i studiet giver anbefaling til tumorindhold for kliniske prøver. Generelt, jo højere tumorindhold, jo højere er "signalet" (VAF, foldændring eller understøttende læsninger) for variationer i tumoren. Anbefalinger for minimum tumorindhold er baseret på følgende observationer. LoD-værdier for små DNA-variationer er ikke højere end 0,104 (med undtagelse af TP53-insertionen). For at detektere aktiverende mutationer i tumoren (0,50 variationsallelfrekvens) anbefales 20 % tumorindhold, således at disse mutationer har 0,10 VAF'er og er ved eller over LoD. Ved et tumorindhold på 20 % ville gener, der var amplificeret til en 5,5 foldændring (11 kopier), blive detekteret konsekvent baseret på en detektionsgrænse på 1,8 foldændring. Ved et tumorindhold på 20 % ville fusioner med 80 understøttede læsninger blive detekteret konsekvent baseret på en detektionsgrænse på 16 understøttende læsninger.

Reproducerbarhed

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

Studie 1

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

Procentdel af positive bestemmelser (PPC'er) og procentdel af negative bestemmelser (PNC'er) for målrettede DNA-variationer og målrettede RNA-fusionsvariationer ved højt niveau blev bestemt som primære endepunkter. PPC og PNC for målrettede RNA-fusionsvariationer på lavt niveau blev beregnet som sekundære endepunkter. Tosidede 95 % konfidensintervaller (CI'er) tilknyttet alle endepunkter blev beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden. Primære analyser blev udført for at estimere PPC og PNC (med tilknyttede 95 % konfidensintervaller) i de målrettede panelementer med højt niveau ved at kombinere observationer fra TSO

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Comprehensive (EU)-analysen i et givent mål i en gruppe af panelelementer, der repræsenterer den relevante variationsklasse (f.eks. små DNA-varianter og RNA-fusioner) på tværs af laboratorier/instrumenter, operatører og kørsler. For hver målrettet variation blev TSO Comprehensive (EU)-analyseobservationer i andre panelelementer med højt niveau målrettet til den samme variationstype, men som ikke indeholdt den samme variation som fastlagt efter flertalsreglen, kombineret til beregnet PNC. Den samlede PPC og PNC for målrettede blev bestemt på lignende måde.

RET Små DNA-varianter

For de små DNA-varianter panelelementer på højt niveau var den samlede PPC 100,0 % (207/207; 95 % CI: 98,2 % til 100,0%) ([Tabel 47](#)). Den samlede PNC for de små DNA-varianter panelelementer på højt niveau var 100,0 % (1035/1035; 95 % CI: 99,6 % til 100,0%) ([Tabel 48](#)). For de små DNA-varianter panelelementer på lavt målrettet niveau var den samlede PPC for de små DNA-varianter panelelementer på lavt målrettet niveau 99,1 % (210/212; 95 % CI: 96,6 % til 99,7 %), og den samlede PNC var 100,0 % (1026/1026; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %).

Tabel 47 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af RET små DNA-varianter i højt og lavt niveau-målrettede panelelementer

Varia- tions- niveau	Varia- tions- type	Målrettet variation (Nukleotid)	Målrettet variation (Amino- syre)	n	Gennem- snitlig VAF	Procent- del af positive bestem- melser (%)	95 % CI*
Høj	SNV	chr10_43617416_T_ C	RET M918T	34	0,156	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Høj	SNV	chr10_43609949_ G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	SNV	chr10_43614996_ G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Høj	MNV	chr10_43609949_ GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Høj	Deletion	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_ G	RET D898_ E901del	33	0,199	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Høj	Insertion	chr10_43609946_ T_TGTGCCGCAC	RET C634_ T636dup	36	0,095	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variations-niveau	Variations-type	Målrettet variation (Nukleotid)	Målrettet variation (Aminosyre)	n	Gennemsnitlig VAF	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI*
Høj	Alle små DNA-variationer høj	Alle små DNA-variationer høj	Alle små DNA-variationer høj	207	IKKE RELEVANT	100,0 % (207/207)	(98,2 %, 100,0 %)
Lav	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Lav	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)
Lav	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Lav	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Lav	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Lav	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Lav	Alle små DNA-variationer lav	Alle små DNA-variationer lav	Alle små DNA-variationer lav	212	IKKE RELEVANT	99,1 % (210/212)	(96,6 %, 99,7 %)

Forkortelser: I/R, gælder ikke; VAF, variations-allele-frekvens

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 48 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af RET små DNA-varianter i højt og lavt niveau-målede panelelementer

Variations-niveau	Variations-type	Målede variation (Nukleotid)	Målede variation (Aminosyre)	n ¹	Procentdel af negative bestemmelser (%)	95 % CI ²
Høj	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 % (173/173)	(97,8 %, 100,0 %)
Høj	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Høj	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Høj	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 % (172/172)	(97,8 %, 100,0 %)
Høj	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Høj	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Høj	Alle små DNA-varianter høj	Alle små DNA-varianter høj	Alle små DNA-varianter høj	1035	100,0 % (1035/1035)	(99,6 %, 100,0 %)
Lav	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 % (143/143)	(97,4 %, 100,0 %)
Lav	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 % (178/178)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variations-niveau	Variations-type	Målrettet variation (Nukleotid)	Målrettet variation (Aminosyre)	n ¹	Procentdel af negative bestemmelser (%)	95 % CI ²
Lav	Alle små DNA-variationer lav	Alle små DNA-variationer lav	Alle små DNA-variationer lav	1026	100,0 % (1026/1026)	(99,6 %, 100,0 %)

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

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

Tabel 49 viser varianskomponentanalysen for variations-allele-frekvenser (VAF'er) på tværs af ca. 36 observationer for hvert panelement. Standardafvigelsen (SD) og procentkoefficienten af variationen (%CV; samlet og for hver kilde) blev beregnet og præsenteret for hver målrettet RET lille DNA-variation.

Tabel 49 Analyse af TSO Comprehensive (EU)-analysevarienskomponenter for VAF i panelelementer for målrettede små DNA-variationer

Variations-niveau	Variations-type	Målrettet variation (Nukleotid)	Målrettet variation (Aminosyre)	n	Gen-nem-snitlig VAF	Labor-ator-ium SD (%CV)	SD for opera-tør (%CV)	Dag SD (%CV)	SD for repli-kat (%CV)	I alt SD (%CV)
Høj	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 %)
Høj	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 %)
Høj	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 %)
Høj	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 %)
Høj	Dele-tion	chr10_43615611_GAGATGTTTATG_A_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 %)

Variations-niveau	Variations-type	Målrettet variation (Nukleotid)	Målrettet variation (Aminosyre)	n	Gen-nem-snitlig VAF	Labor-ator-ium SD (%CV)	SD for opera-tør (%CV)	Dag SD (%CV)	SD for repli-kat (%CV)	I alt SD (%CV)
Høj	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0 %)	0,000 (0,0 %)	0,000 (0,0 %)	0,009 (9,6 %)	0,010 (10,1 %)
Lav	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 %)
Lav	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 %)
Lav	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 %)
Lav	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 %)
Lav	Deletion	chr10_43615611_GAGATGTTTATG A_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 %)
Lav	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8 %)	0,000 (0,0 %)	0,003 (9,1%)	0,006 (15,9%)	0,008 (22,9%)

NTRK 1-3 og RET-fusioner

For panelelementer med højt niveau i RNA-fusioner var den samlede PPC 99,3 % (285/287; 95 % CI: 97,5 % til 99,8 %) (Tabel 50). PPC var 100 % for hvert panelelement med højt niveau, med undtagelse af panelelementet BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % CI: 81,9 % til 98,5 %]). Den samlede PNC for panelelementer med højt niveau i RNA-fusioner var 100,0 % (1724/1724; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %) (Tabel 51). For panelelementer med lavt niveau i målrettede RNA-fusioner var den samlede PPC 95,4 % (272/285; 95 % CI: 92,3 %, 97,3 %), og den samlede PNC var 100,0 % (1851/1851; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 50 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af NTRK- og RET-fusioner i målrettede panelelementer med højt og lavt niveau

Variations-niveau	Målrettet fusion	n	Gennemsnitlige understøttende læsninger	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI*
Høj	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 % (34/36)	(81,9 , 98,5 %)
Høj	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Høj	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høj	Alle fusioner Høj	287	36,5	99,3 % (285/287)	(97,5 %, 99,8 %)
Lav	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 % (34/36)	(81,9 , 98,5 %)
Lav	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 % (29/36)	(65,0 %, 90,2 %)
Lav	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)
Lav	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Lav	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Lav	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variations-niveau	Målrettet fusion	n	Gennemsnitlige understøttende læsninger	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI*
Lav	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 % (35/36)	(85,8 %, 99,5 %)
Lav	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 % (33/34)	(85,1 %, 99,5 %)
Lav	Alle fusioner Lav	285	16,8	95,4 % (272/285)	(92,3 %, 97,3 %)

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

Tabel 51 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analysen til detektering af NTRK- og RET-fusioner i ikke-målrettede panelelementer med højt og lavt niveau

Variations-niveau	Målrettede fusioner	n ¹	Procentdel af negative bestemmelser (%)	95 % CI ²
Høj	LMNA-NTRK1	180	100,0 % (180/180)	(97,9 %, 100,0 %)
Høj	BCAN-NTRK1	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Høj	ETV6-NTRK2	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Høj	TRIM24-NTRK2	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Høj	ETV6-NTRK3	144	100,0 % (144/144)	(97,4 %, 100,0 %)
Høj	BTBD1-NTRK3	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Høj	NCOA4-RET	215	100,0 % (215/215)	(98,2 %, 100,0 %)
Høj	CCDC6-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Høj	Alle fusioner - Høj	1724	100,0 % (1724/1724)	(99,8 %, 100,0 %)
Lav	LMNA-NTRK1	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Lav	BCAN-NTRK1	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Lav	ETV6-NTRK2	250	100,0 % (250/250)	(98,5 %, 100,0 %)
Lav	STRN-NTRK2	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Lav	ETV6-NTRK3	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	BTBD1-NTRK3	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Lav	NCOA4-RET	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Lav	KIF5B-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variations-niveau	Måltrettede fusioner	n ¹	Procentdel af negative bestemmelser (%)	95 % CI ²
Lav	Alle fusioner – Lav	1851	100,0 % (1851/1851)	(99,8 %, 100,0 %)

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

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

Tabel 52 viser varianskomponentanalysen af understøttende læsninger på tværs af ca. 36 observationer med hver måltrettede fusion. SD og %CV (i alt og for hver kilde) blev beregnet og præsenteret for hver måltrettet fusion.

Tabel 52 TSO Comprehensive (EU)-analysen – Varianskomponentanalyse af understøttende læsninger i panelelementer i måltrettede RNA-fusioner

Variations-niveau	Fusion	n	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for sted (%CV)	SD for operatør (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for replikat (%CV)	SD i alt (%CV)
Høj	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9 %)	3,37 (9 %)	6,93 (18 %)	9,04 (24 %)	12,39 (33 %)
Høj	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41 %)	7,87 (23 %)	5,40 (16 %)	8,95 (27 %)	18,98 (57 %)
Høj	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33 %)	3,50 (14 %)	4,20 (17 %)	4,86 (20 %)	10,86 (44 %)
Høj	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31 %)	4,24 (12 %)	6,82 (19 %)	6,87 (19 %)	15,57 (43 %)
Høj	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20 %)	10,20 (18 %)	9,25 (16 %)	8,69 (15 %)	19,93 (35 %)
Høj	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5 %)	2,65 (8 %)	2,16 (7 %)	10,47 (32 %)	11,11 (34 %)
Høj	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13 %)	4,09 (11 %)	6,17 (17 %)	5,20 (14 %)	10,17 (28 %)
Høj	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22 %)	2,56 (8 %)	6,53 (20 %)	5,51 (16 %)	11,49 (34 %)
Lav	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13 %)	0,00 (0 %)	2,74 (20 %)	4,37 (32 %)	5,47 (40 %)
Lav	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17 %)	2,98 (18 %)	4,61 (27 %)	5,82 (34 %)	8,52 (50 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variations-niveau	Fusion	n	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for sted (%CV)	SD for operatør (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for replikat (%CV)	SD i alt (%CV)
Lav	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0 %)	3,41 (22 %)	3,83 (25 %)	4,39 (29 %)	6,75 (45 %)
Lav	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13 %)	0,61 (5 %)	2,33 (17 %)	2,57 (19 %)	3,95 (29 %)
Lav	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24 %)	3,46 (14 %)	0,00 (0 %)	6,39 (26 %)	9,44 (38 %)
Lav	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	6,64 (37 %)	6,71 (37 %)
Lav	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13 %)	1,03 (7 %)	0,00 (0 %)	5,11 (32 %)	5,61 (36 %)
Lav	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12 %)	0,00 (0 %)	1,58 (10 %)	5,83 (35 %)	6,39 (39 %)

%CV: Procent variationskoefficient.

SD: Standardafvigelse.

Studie 2

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

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

LOD er den analytkoncentration, hvor observerede analyseresultater er 'positive' (detekteret variation i forhold til skæringsværdien for TSO Comprehensive (EU)-analysen) ≥ 95 % af tiden. Observerede gennemsnitlige variationsniveauer blev kategoriseret som omtrent <2×LOD (observerede variationsniveauer ved <1,5×LOD), ~2-3×LOD (observerede variationsniveauer ved 1,5×LOD til 3,4×LOD) og omtrent >3×LOD (observerede variationsniveauer ved >3,4×LOD).

Procentdel af positive bestemmelser (PPC'er) for små DNA-varianter, genamplifikationer, MSI-høj (MSI-H) og RNA-varianter blev beregnet ved at kombinere observationer på tværs af sekventeringskørsler og laboratorier. På samme måde blev procentdel af negative bestemmelser (PNC'er) beregnet for små DNA-

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

Små DNA-variationer

Tabel 53 viser PPC'er for målrettede små DNA-variationer. PPC'er varierede fra 91,3 % for en BRAF SNV til 100 % for størstedelen af DNA-variationerne.

Tabel 53 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af små DNA-variationer i kombinerede, målrettede panelelementer

Obser- veret varia- tions- niveau ¹	Variations- type	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (aminosyre)	Gennem- snitlig VAF ²	Procent- del af positive bestem- melser (%)	95 % CI ³
~2-3 x LOD	DELETION	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0.181	100.0% (28/28)	(87.9%, 100.0%)
~2-3 x LOD	DELETION	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100.0% (40/40)	(91.2%, 100.0%)
~2-3 x LOD	INSERTION	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	INSERTION	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 x LOD	INSERTION	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 % (4/4)	(51,0 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 % (42/46)	(79,7 %, 96,6 %)
~2-3 x LOD	DELETION	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0.112	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	DELETION	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)

Obser- veret varia- tions- niveau ¹	Variations- type	Målrettet variation (nukleotid)	Målrettet variation (aminosyre)	Gennem- snitlig VAF ²	Procent- del af positive bestem- melser (%)	95 % CI ³
~2-3 x LOD	INSERTION	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	INSERTION	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	DELETION	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
<2 x LOD	INSERTION	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 % (2/2)	(34,2 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	INSERTION	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Variationsniveau beregnet fra observeret gennemsnitlig variationsallelfrekvens.

² Gennemsnitlig variationsallelfrekvens beregnet fra observerede analyseresultater.

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

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

Tabel 54 viser varianskomponentanalysen af resultater for variationsallelfrekvenser (VAF) for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer med målrettede små DNA-varianter.

Tabel 54 Varianskomponentanalyse af VAF for målrettede små DNA-varianter

Målrettet variation	N	Gennem- snitlig VAF	SD for sted (%CV)	SD for operatør (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operatør) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_ CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Målet variation	N	Gennem- snitlig VAF	SD for sted (%CV)	SD for operatør (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operatør) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
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_ GGAATTAAGAGAAGC A_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)

Målet variation	N	Gennem- snitlig VAF	SD for sted (%CV)	SD for operatør (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operatør) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Der var 2 små målede DNA-varianter, for hvilke antallet af observationer var for lille til, at en varianskomponentmodel kunne tilpasses. For disse 2 målede varianter var samlede SD'er 0,027 for variation chr1_27024001_C_CG og 0,001 for variation chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genamplifikationer

Tabel 55 viser PPC'er for målede genamplifikationer. PPC'er var 100,0 % for MET og 100,0 % for ERBB2.

Tabel 55 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af genamplifikationer i kombinerede, målede panelelementer

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

¹ Variationsniveau beregnet fra observeret, gennemsnitlig foldændring.

² Gennemsnitlig foldændring beregnet fra observerede analyseresultater.

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

PNC'er var 100 % på tværs af genamplifikationer.

Tabel 56 viser varianskomponentanalysen af resultater for foldændring for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer med målede genamplifikationer.

Tabel 56 Varianskomponentanalyse af foldændring for målrettede genamplifikationer

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

MSI

Tabel 57 viser PPC'er for målrettede MSI-H-panelementer. PPC'er var 100 % for begge MSI-H-panelementer.

Tabel 57 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af MSI-H-status i kombinerede, målrettede panelementer

Panelement	Gennemsnitlig MSI-score ¹	N	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI ²
TPSBD4	60.5	36	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
TPSBD6	55.7	32	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)
Alle elementer		68	100.0% (68/68)	(94.7%, 100.0%)

¹ Observeret gennemsnitlig MSI-score beregnet fra observerede analyseresultater.

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

Tabel 58 viser varianskomponentanalysen af resultater for MSI-score for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelementer målrettet for MSI-H-status.

Tabel 58 Varianskomponentanalyse for MSI-score for målrettede MSI-H-panelementer

Panelement	N	Gennemsnitlig MSI-score	SD for sted (%CV)	SD for operator (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operator) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
TPSBD4	36	60.5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55.7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

For at evaluere reproducerbarheden af TMB-scorer blev en kvantitativ analyse af scoren udført i målrettede TMB-panelementer, hvilket repræsenterede et interval af forventede TMB-scorer. [Tabel 59](#) viser varianskomponentanalysen af resultater for TMB-score for hver kilde af variation og samlet variation i TMB-panelementerne. Samlede SD'er for TMB-score var 1,0 (%CV = 13) for ét panelement (gennemsnitlig TMB-score = 7,6) og 1,1 (%CV = 2) for et andet panelement (gennemsnitlig TMB-score = 63,2).

Tabel 59 Varianskomponentanalyse for TMB-score for målrettede TMB-panelementer

Panelement	N	Gennemsnitlig TMB-score	SD for sted (%CV)	SD for operatør (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operatør) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0.2 (2)	0,0 (0)	0.8 (10)	0,0 (0)	0.5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0.3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1.1 (2)

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

RNA-variationer

[Tabel 60](#) viser PPC'er for målrettede RNA-variationer. PPC'er varierede fra 91,7 % for KIF5B-RET til 100 % for størstedelen af RNA-variationerne.

Tabel 60 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analysen for detektering af RNA-variationer i kombinerede, målrettede panelementer

Observeret variations-niveau ¹	Variationstype	Målrettet variation	Gennemsnitlige understøttende læsninger ²	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI ³
~2-3 x LOD	Fusion	ACPP-ETV1	44,7	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observeret variations-niveau ¹	Variationstype	Målettet variation	Gennemsnitlige understøttende læsninger ²	Procentdel af positive bestemmelser (%)	95 % CI ³
~2-3 x LOD	Fusion	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	EML4-ALK	49,3	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	FGFR1-GSR	61,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 x LOD	Fusion	KIF5B-RET	11,6	91,7 % (44/48)	(80,4 %, 96,7 %)
<2 x LOD	Fusion	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 x LOD	Fusion	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 x LOD	Fusion	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Fusion	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 % (47/48)	(89,1 %, 99,6 %)
~2-3 x LOD	Splejsningsvariation	EGFR vIII	64,0	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3 x LOD	Splejsningsvariation	Springer MET exon 14 over	61,2	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Variationsniveau beregnet fra gennemsnitlige observerede understøttende læsninger.

² Gennemsnitlige understøttende læsninger beregnet fra observerede analyseresultater.

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

Tabel 61 viser varianskomponentanalysen af resultater for understøttende læsninger for hver kilde af variation og samlet variation i alle panelelementer med målrettede RNA-variationer.

Tabel 61 Varianskomponentanalyse af understøttende læsninger for målrettede RNA-variationer

Målrettet variation	N	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for sted (%CV)	SD for operatør (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operatør) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
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)

Målettet variation	N	Gennemsnitlige understøttende læsninger	SD for sted (%CV)	SD for operatør (sted) (%CV)	SD for dag (sted, operatør) (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for kørsel (%CV)	SD i alt (%CV)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR VIII-splejsningsvariation	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Springer MET exon 14-splejsningsvariation over	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Intralaboratoriepræcision

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

Studie 1

Intralaboratoriepræcision blev evalueret for NTRK1-3-fusioner (lavgradsgliom, glioblastom, myofibroblastisk sarkom, sekretorisk brystkræft), RET-fusioner (thyreoideacancer og hudvæv fra en ukendt cancer) og RET små DNA-varianter (medullær thyreoideacancer) med FFPE-væv fra den indikerede cancer. Hver af prøverne blev testet på to variationsniveauer: ~1x LoD (lavt variationsniveau) og ~2-3x LoD (højt variationsniveau) med undtagelse af prøven indeholdende CCDC6-RET, der kun blev testet på det lave variationsniveau. Hver af prøverne på hvert testniveau blev kørt to gange i hver klargøring af bibliotek på tværs af tre (3) operatører. Hver operatør påbegyndte klargøring af bibliotek på tre (3) ikke på hinanden følgende dage og sekventerede på tre (3) udpegede NextSeq 550Dx-instrumenter. Tre (3) reagenspartier blev testet og genererede 54 observationer pr. niveau. Nogle niveauer havde færre end 54 observationer som følge af ugyldige biblioteker.

Kvalitativ analyse

Den kvalitative konkordans ved variationsbestemmelse blev evalueret separat for de to variationsniveauer for en given variation fra samlede observationer på tværs af alle variabler (operatører, reagenspartier, instrumenter, dage og replikater). Procentdelen af positive bestemmelser (PPC) og procentdelen af negative bestemmelser (PNC) og det tilknyttede to-sidede 95 % konfidensinterval (Wilson-score) er opsummeret i [Tabel 62](#) (små DNA-varianter) og [Tabel 63](#) (RNA-fusioner).

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

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

Tabel 62 Kvalitative resultater for målrettede DNA-varianter

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 63 Kvalitative resultater for målrettede RNA-varianter

Variationsniveau	Fusion	Gennemsnitlige understøttende læsninger	PPC (95 % CI)	PNC (95 % CI)
Lav	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (270/270) (98,6-100,0 %)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 % (51/54) (84,9-98,1 %)	100,0 % (324/324) (98,8-100,0 %)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100 % (324/324) (98,8-100,0 %)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (270/270) (98,6-100,0 %)
	ETV6-NTRK3 (FFPE-cellelinje)	23,1	98,1 % (53/54) (90,2-99,7 %)	
	NCOA4-RET	13,3	90,7 % (49/54) (80,1-96,0 %)	100,0 % (270/270) (98,6-100,0 %)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 % (53/54) (90,2-99,7 %)	100,0 % (324/324) (98,8-100,0 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variationsniveau	Fusion	Gennemsnitlige understøttende læsninger	PPC (95 % CI)	PNC (95 % CI)
Høj	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (216/216) (98,3-100,0 %)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (270/270) (98,6-100,0 %)
	ETV6-NTRK2	52	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (270/270) (98,6-100,0 %)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (216/216) (98,3-100,0 %)
	ETV6-NTRK3 (FFPE cellelinje)	28,3	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	
	NCOA4-RET	24,8	100,0 % (54/54) (93,4-100,0 %)	100,0 % (216/216) (98,3-100,0 %)
	CCDC6-RET	IKKE RELEVANT	Ikke testet	100,0 % (324/324) (98,8-100,0 %)

Kvantitativ analyse

Variansanalyse for begrænset maksimal sandsynlighed (REML) for komponenter blev udført for at evaluere samlet variation af den underliggende, kontinuerlige variabel (VAF for små DNA-varianter og understøttende læsninger for RNA-fusioner) og estimering af komponenterne for præcision [standardafvigelse (SD), variationskoefficient (CV)] for hver kilde af variation [operatører, instrumenter, dage, reagenspartier, rest og samlet]. Resultaterne er vist i [Tabel 64](#) for små DNA-varianter og [Tabel 65](#) for RNA-fusioner.

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

Tabel 64 Kvantitative SD- og CV-resultater for målrettede små DNA-varianter

VAF-niveau	Variation	Variations-type	Ingen gyldige forsøg	Gennemsnitlig VAF	Operatør SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Parti SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Rest SD (%CV)	I alt SD (%CV)
Lav (~1 x LoD)	RET D898_E901del	DELETION	54	0,048	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (8,7)	0,014 (30,0)	0,015 (31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (31,3)	0,014 (31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000 (0,0)	0,001 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (25,6)	0,011 (25,7)
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (3,3)	0,000 (0,0)	0,009 (30,7)	0,009 (30,9)
	RET D631_L633delinsE	DELETION	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
Høj (~3x LoD)	RET D898_E901del	DELETION	54	0,088	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (1,4)	0,006 (7,0)	0,017 (19,2)	0,018 (20,5)
	RET C618R	SNV	54	0,146	0,003 (1,7)	0,000 (0,0)	0,020 (13,7)	0,002 (1,1)	0,018 (12,6)	0,027 (18,7)
	RET M918T	SNV	52	0,078	0,002 (3,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (9,1)	0,018 (23,1)	0,020 (25,0)
	RET C634Y	MNV	54	0,095	0,000 (0,0)	0,002 (2,5)	0,002 (2,1)	0,000 (0,0)	0,014 (15,0)	0,015 (15,3)
	RET D631_L633delinsE	DELETION	52*	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

* Inkluderer 20 observationer, der ikke bestod kvalitetskontrol for median exondækning, men som har dækning ved positionen for RET-varianter, der var en del over skæringsværdien for lav dybde på 100 (gennemsnitlig dybde=374).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 65 Kvantitative SD- og CV-resultater for målrettede RNA-fusioner

Niveau af understøttende læsninger	Fusion	Ingen gyldige forsøg	Gennemsnitlige understøttede læsninger	SD for operatør (%CV)	SD for instrument (%CV)	SD for parti (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for rest (%CV)	SD i alt (%CV)
Lav	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,3 (11,5)	0,9 (4,7)	3,3 (16,4)	0,8 (4,1)	5,7 (28,2)	7,1 (35,2)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,4 (15,3)	1,4 (6,4)	1,8 (8,0)	0,0 (0,0)	6,0 (27,2)	7,3 (32,9)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,0 (0,0)	3,2 (15,7)	4,4 (21,5)	0,0 (0,0)	8,3 (40,8)	9,9 (48,7)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,3 (14,0)	2,4 (14,6)	2,2 (13,4)	0,0 (0,0)	4,7 (28,7)	6,1 (37,5)
	ETV6-NTRK3 (cellelinje)	54	23,1	4,6 (19,7)	1,2 (5,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,7 (29,1)	8,2 (35,5)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,7 (12,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (12,6)	5,1 (38,3)	5,6 (42,2)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,0 (0,0)	1,1 (6,1)	5,4 (29,1)	0,0 (0,0)	6,2 (33,0)	8,3 (44,4)
Høj	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,2 (19,6)	1,2 (2,1)	5,7 (9,9)	2,0 (3,5)	11,9 (20,8)	17,4 (30,5)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,2 (15,5)	0,8 (1,4)	5,6 (10,5)	2,9 (5,4)	11,3 (21,3)	15,4 (28,9)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,0 (0,0)	4,1 (7,8)	7,1 (13,6)	5,7 (11,0)	12,9 (24,9)	16,3 (31,4)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,2 (17,2)	0,4 (1,0)	6,4 (15,4)	0,0 (0,0)	10,7 (25,8)	14,4 (34,6)
	ETV6-NTRK3 (cellelinje)	54	28,3	7,9 (28,0)	1,0 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	9,1 (32,0)	12,1 (42,6)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,1 (12,3)	0,0 (0,0)	5,9 (23,9)	0,0 (0,0)	6,8 (27,3)	9,5 (38,3)

Studie 2

Intralaboratoriepræcision blev evalueret for TMB og MSI. Fem NSCLC FFPE DNA-prøver for TMB og 7 CRC FFPE-prøver for MSI, inklusive både mikrosatellitstabil (MSS) og MSI-høj, blev anvendt til at evaluere præcision på forskellige niveauer på tværs af intervallerne for score. Hver af prøverne blev kørt to gange på tværs af 3 operatører, 3 dage med 3 klargøringer af bibliotek for 3 reagentspartier med 3 NextSeq 550Dx-instrumenter og genererede 54 observationer pr. niveau.

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

Den samlede variation i TMB- og MSI-score blev sammen med bidraget fra kilden (instrumenter, operatører, partier, dage og rest) kvantificeret ved hjælp af en varianskomponentmodel på tværs af et interval for score. Standardafvigelsen (SD) og varianskoefficienten (CV) er vist i [Tabel 66](#) for TMB og [Tabel 67](#) for MSI efter niveau. Nogle niveauer havde færre end 54 observationer som følge af ugyldige biblioteker.

Tabel 66 Kvantitative resultater for TMB-score, SD og CV

Niveau	Gennemsnitlig TMB-score	Ingen gyldige forsøg	Operatør SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Parti SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Rest SD (%CV)	I alt 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 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 67 Kvantitative resultater for MI-score, SD og CV

MSI-status	Niveau	Gennemsnitlig MSI-score (%)	Ingen gyldige forsøg	Operatør SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Parti SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Rest SD (%CV)	I alt 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-høj	L3	48,68	53	0,19 (0 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	1,19 (2 %)	2,48 (5 %)	2,76 (6 %)
	L4	56,85	54	1,66 (3 %)	0,00 (0 %)	1,92 (3 %)	0,00 (0 %)	3,07 (5 %)	3,98 (7 %)
	L5	72,62	54	0,00 (0 %)	0,47 (1 %)	0,34 (0 %)	0,62 (1 %)	1,28 (2 %)	1,54 (2 %)
	L6	75,29	54	0,00 (0 %)	0,42 (1 %)	0,09 (0 %)	0,00 (0 %)	1,46 (2 %)	1,52 (2 %)
	L7	78,38	54	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,45 (1 %)	0,95 (1 %)	1,06 (1 %)

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

Restkomponenten forblev den største medvirkende årsag til samlet varians for både MSI- og TMB-scorer, hvilket understøtter konklusionen om, at scorerne er robuste for operatører, partier, instrumenter og dage.

C5- og C95-værdier i nærheden af skæringsværdien på 20,00 % blev bestemt for MSI ved hjælp af en præcisionsprofil (Tabel 68).

Tabel 68 C5-C95-intervaller for MSI

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

Idet både MSI og TMB er komplekse biomarkører, kan analytisk ydeevne variere fra prøve til prøve. Det vil sige, at TMB-variation ikke kun afhænger af TMB-værdien, men også af sammensætningen af variationer i prøven, såsom variationstype (SNV, indel) og VAF-niveauer (tæthed på inklusionsgrænsen). På samme måde afhænger MSI-variation ikke kun af MSI-værdien, men også af sammensætningen af stederne i prøven, såsom antallet af steder, der er ustabile og mængden af ustabilitet pr. sted.

Tumorindholdets indvirkning på TMB- og MSI-scorer blev evalueret. For de fleste prøver havde et tumorindhold på ≥ 30 % en ubetydelig indvirkning på TMB-scorer over ca. 10 mutationer pr. megabase. TMB-scorer forblev relativt uændrede med øget tumorindhold. For MSI-høj-prøver udviste tumorindholdet en positiv, lineær

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

korrelation med MSI-score. MSI-høj-prøver forblev i gennemsnit MSI-H ved et tumorindhold på $\geq 30\%$. Endometrielle prøvers adfærd var markant anderledes end de andre vævstypers, og det blev fundet, at en større mængde tumorindhold var påkrævet for at blive bestemt som MSI-H.

Præcision af tumorprofilering

Detektering af variationer ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne for referencemetoderne. Små DNA-varianter og TMB blev sammenlignet med en metode med next-generation-sekventering (NGS) af eksternt, helt exom. Genamplifikationer blev sammenlignet med den samme NGS-metode eller valideret dobbelt in-situ hybridisering (DISH) for HER2-amplifikationer. MSI blev evalueret med en valideret MSI-PCR-test. RNA-splejningsvariationer blev sammenlignet med en valideret, kvantitativ PCR (qPCR)-metode. ROS1- og ALK-fusioner blev sammenlignet med validerede FISH-analyser. Alle andre fusioner blev sammenlignet med en sammensat metode, der bestod af et valideret, helt RNA-exom, NGS-analyse (RNGS1), et målrettet NGS-panel (RNGS2) og ddPCR (droplet digital PCR).

Detektering af små DNA-varianter

Detekteringen af små DNA-varianter ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne af sekventering af helt exom (WES), der anvender WES med prøver med tumor og normal sat sammen til bestemmelse af kimceller og små somatiske varianter. Sammenligningen mellem små varianter, der består af enkeltnukleotidvarianter (SNV'er), insertioner og deletioner, var baseret på 124 prøver fra 14 forskellige vævstyper, der begge var valideret for både TSO Comprehensive (EU) og WES. I modsætning til WES-analysen kan TSO Comprehensive (EU) detektere multinukleotidvarianter (MNV'er, 2-3bp), der kræver faseopdeling. TSO Comprehensive (EU) MNV'er blev evalueret som individuelle SNV'er mod WES. En oversigt over konkordans på variationsniveau, inklusive positiv procentvis overensstemmelse (PPA) og negativ procentvis overensstemmelse (NPA) for alle variationsbestemmelser, er vist i [Tabel 69](#).

Tabel 69 Oversigt over konkordans for bestemmelse af små varianter evalueret efter kimcelle eller somatisk status

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

SNV'er, insertioner og deletioner blev også evalueret individuelt for konkordans ([Tabel 70](#), [Tabel 71](#) og [Tabel 72](#)).

Tabel 70 Oversigt over konkordans mellem TSO Comprehensive (EU) og WES for små DNA-variationer (SNV'er)

SNV'er	WES, somatisk bestemt	WES, kimcellebestemt	WES, ikke bestemt	I alt
TSO Comprehensive (EU)-bestemmelse	320	33.107	369	33.796
TSO Comprehensive (EU) ikke bestemt	58	40	70.000.687	70.000.785
I alt	378	33.147	70.001.056	70.034.581

Tabel 71 Oversigt over konkordans mellem TSO Comprehensive (EU) og WES for DNA-insertioner

Insertioner	WES, somatisk bestemt	WES, kimcellebestemt	WES, ikke bestemt	I alt
TSO Comprehensive (EU)-bestemmelse	15	23	18	56
TSO Comprehensive (EU) ikke bestemt	5	17	70.034.504	70.034.526
I alt	20	40	70.034.522	70.034.582

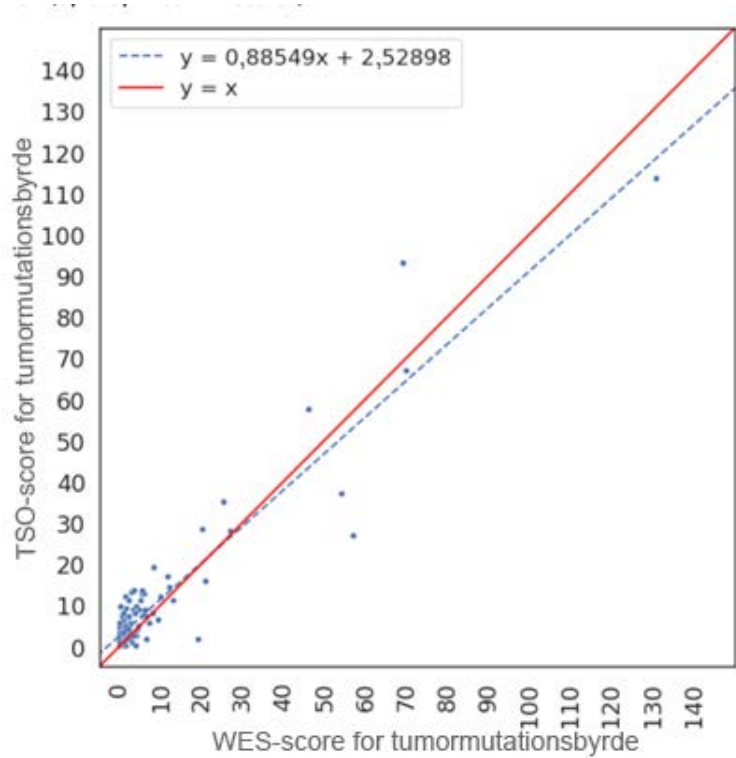
Tabel 72 Oversigt over konkordans mellem TSO Comprehensive (EU) og WES for DNA-deletioner

Deletioner	WES, somatisk bestemt	WES, kimcellebestemt	WES, ikke bestemt	I alt
TSO Comprehensive (EU)-bestemmelse	47	33	39	119
TSO Comprehensive (EU) ikke bestemt	6	4	70.034.453	70.034.463
I alt	53	37	70.034.492	70.034.582

Detektering af tumormutationsbyrde

TMB-konkordans blev bestemt ved at sammenligne TMB-scorer (somatiske mutationer/megabase) mellem WES-metoden og TSO Comprehensive (EU) for 124 prøver med tilgængelige data fra både TSO Comprehensive (EU) og WES. Lineær regressionsanalyse med WES som prædikator havde et y-skæringspunkt på 2,53, en hældning på 0,89 og en Pearsons korrelationskoefficient på 0,94 (Figur 5).

Figur 5 TMB-score for korrelation mellem WES og TSO Comprehensive (EU)



Detektering af genamplifikation

Detektering af genamplifikationer ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne af den samme WES-analyse ved anvendelse af enten en prøve med tumor eller normal sat sammen eller prøver udelukkende med tumor. Der var i alt 420 prøver, heraf 183 fra metoden ortogonal tumor/normal og 237 fra metoden udelukkende med tumor. Prøverne stammede fra 14 vævstyper og indeholdt amplifikationer fra 55 gener. TSO Comprehensive (EU) rapporterer genamplifikationer fra MET- og ERBB2-gener. Nøjagtigheden blev imidlertid vurderet for alle 55 gener. En oversigt over genamplifikationsbestemmelserne er vist i Tabel 73.

Tabel 73 Genamplifikationsbestemmelser

	WES, positiv	WES, negativ
TSO Comprehensive (EU) positiv	337	415

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

	WES, positiv	WES, negativ
TSO Comprehensive (EU) negativ	28	24.000
I alt	365	24.415
Procentvis overensstemmelse	PPA: 92 % (337/365) 95 % CI:[89 %, 95 %]	NPA: 98,3 % (24.000/24.415) 95 % CI:[98,1 %, 98,5 %]

ERBB2 (HER2) amplifikationer i gastrisk væv og brystvæv blev analyseret adskilt fra andre genamplifikationer ved hjælp af en dobbelt in-situ-hybridiseringsmetode (DISH). I alt blev 116 prøver med brystvæv og gastrisk væv, hvoraf 64 tidligere var blevet karakteriseret som HER2-positive ved hjælp af IHC eller FISH, testet. Én prøve bestod ikke ekstraktion, 3 prøver bestod ikke validitet for TSO Comprehensive (EU), og 3 prøver bestod ikke validitet for DISH-analysen. Ud af de 108 prøver havde 20 (18,5 %) borderline-scorer (mellem 1,5 og 2,5) tæt på DISH-skæringsværdien på 2,0. Konkordansresultater, herunder PPA, NPA for alle prøver samt eksklusive borderline HER2 DISH-tilfælde, er vist i [Tabel 74](#).

Tabel 74 Oversigt over overensstemmelse mellem TSO Comprehensive (EU) og HER2DISH, inklusive for HER2-genamplifikation

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

Detektering af mikrosatellit-instabilitet

Detektering af mikrosatellit-instabilitet ved hjælp af TSO Comprehensive (EU)-analysen blev sammenlignet med resultaterne af en valideret MSI-PCR-test, der anvender prøver med tumor sat sammen med normal til test. I alt 195 prøver, der opfyldte kravet til tumorindhold på ≥ 30 % og repræsenterede 14 vævstyper, blev sammenlignet. MSI-PCR evaluerer 5 steder, og har tre resultater – MSS (ingen ustabile steder), MSI-Low (MSI-Lav) (1 ustabil sted) og MSI-High (MSI-Høj) (2 eller flere ustabile steder). TSO Comprehensive (EU) evaluerer op til 130 mikrosatellit-steder, og klassificerer kun prøver som MSS eller MSI-High (MSI-Høj) (≥ 20 % ustabile steder). MSI-Low (MSI-Lav) blev grupperet med MSS-resultater for MSI-PCR. Konkordansanalyse er vist i [Tabel 75](#).

Tabel 75 Oversigt over konkordansanalyse mellem TSO Comprehensive (EU) og MSI-PCR for mikrosatellit-instabilitet for DNA

MSI-instabilitet	PCR MSI-High (MSI-Høj)	PCR MSI-Low (MSI-Lav)	PCR MSS
TSO Comprehensive (EU), ustabil (MSI-High) (MSI-Høj)	40	2	0
TSO Comprehensive (EU), stabil (MSS)	3	0	150
I alt	43	2	150
Procentvis overensstemmelse	PPA: 93 % (40/43) 95 % CI: [81 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % CI: [95 %, >99 %]	

Detektering af RNA-splejsningsvariationer

Nøjagtighed for detektering af splejsningsvariation blev beregnet ved at sammenligne TSO Comprehensive (EU)-resultater med qPCR-analyser for EGFRvIII og Met Exon 14del, inklusive ét kendt, positivt RNA for hver af splejsningsvariationerne. Konkordansanalyse blev udført på i alt 230 unikke FFPE RNA-prøver fra 14 vævstyper med tilgængelige data fra både TSO Comprehensive (EU) og referencemetoden. Alle prøver blev testet for MET Exon 14del, mens EGFRvIII kun blev testet i hjernevæv. 3 prøver kaldet positive for MET Exon 14 del ved qPCR, men ikke ved TSO Comprehensive (EU), havde et gennemsnit på Ct>37 og var kunder LoD-niveauet for TSO Comprehensive (EU).

Tabel 76 Oversigt over konkordansanalyse mellem TSO Comprehensive (EU) og qPCR-analyse for RNA-splejsningsvariationer

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

Detektering af RNA-fusion

Sammenligning med en sammensat metode

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

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

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

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

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

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

Konkordansresultaterne for de sammensatte metoder (RNGS1, RNGS2 og ddPCR) for fusioner er vist i [Tabel 77](#).

De 63 fusioner, der stemte overens med den sammensatte metode, repræsenterede 43 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet. Fusioner er imidlertid kun egnede til rapportering fra 23 af de gener, der er indikeret i [TSO Comprehensive \(EU\)-analysegenpanel på side 2](#).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 77 Krydstabulering af resultater fra TSO Comprehensive (EU) i forhold til overensstemmelsesmetoden for RNA-fusioner (253 prøver)

Fusioner	Overensstemmelsesmetode, positiv	Overensstemmelsesmetode, negativ
TSO Comprehensive (EU) positiv	63 ¹	18
TSO Comprehensive (EU) negativ	14 ²	13.821
I alt	77	13.839
Procentvis overensstemmelse	PPA: 82 % (63/77) 95 % CI: [72 %, 89 %]	NPA: 99,9 % (13821/13839) 95 % CI: [99,8 %, 99,9 %]

¹ 63 TSO Comprehensive (EU) sandt positive = 9 positive i overensstemmelse med RNGS1 + 13 positive i overensstemmelse med RNGS2 + 41 positive i overensstemmelse med ddPCR

² 14 TSO Comprehensive (EU) falsk negative = 4 negative ikke i overensstemmelse med RNGS1 + 1 negativ ikke i overensstemmelse med RNGS2 + 9 negative ikke i overensstemmelse med ddPCR

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

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

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

Prøvevaliditet

Prøvevaliditet (første forsøg) blev målt for 181 unikke RNA- og 272 unikke DNA-prøver fra FFPE-blokkke ≤ 5 år. Disse prøver blev udvalgt baseret på vævstype og tilgængeligt materiale, analysevaliditeten var ukendt. For at en variationstype kan anses for at være gyldig, skal biblioteket bestå målinger for kvalitetskontrol. Prøvevaliditeten blev evalueret separat for hver af variationstyperne (små DNA-variationer/TMB, MSI, genamplifikationer, fusioner, splejningsvariationer) og er vist i [Tabel 78](#).

Tabel 78 Prøvevaliditet

Variationstype	Prøvevaliditet
Fusioner/splejningsvariationer (RNA)	76 %
Små DNA-varianter/TMB	75 %
MSI	72 %
Genamplifikation	94 %

Oversigt over analytisk validering

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

- Små DNA-varianter – SNV'er, MNV'er, insertioner og deletioner
- TMB
- MSI
- MET og ERBB2 (HER2) genamplifikationer (se [TSO Comprehensive \(EU\)-analysepanel på side 2.](#))
- 23 gener, for hvilke fusioner kan detekteres (se [TSO Comprehensive \(EU\)-analysepanel på side 2.](#))
- EGFR- og MET-splejningsvariationer (se [TSO Comprehensive \(EU\)-analysepanel på side 2.](#))

Klinisk ydeevne

For at validere TSO Comprehensive (EU)-analysen som en ledsagende diagnosticering (CDx) til udvælgelsen af patienter til behandling med VITRAKVI® (larotrectinib; Bayer AG), blev prøver fra patienter tilmeldt i de kliniske prøver af larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; omtales samlet som larotrectinib-prøverne) ved hjælp af dataskæringsdato den 15. juli 2019, suppleret af kommercielt sourcede FFPE-vævsprøver, testet til at understøtte et TSO Comprehensive (EU)-analysepræcisionsstudie og klinisk bridging-studie.

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

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

Præcisionsstudie for NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusionsdetektion

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

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

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

En krydstabulering af resultater for de 499 prøver er vist i tabel 1. Ud af de 499 prøver havde 85 prøver ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater; ud af disse 85 havde 53 også ugyldige resultater efter ortogonal metode. Yderligere 7 prøver havde ugyldige ortogonale metoderesultater. Således havde 407 af 499 prøver gyldige resultater efter begge metoder.

Tabel 79 NTRK-præcisionsstudie: Krydstabulering af TSO Comprehensive (EU)-resultater versus resultater fra ortogonal metode til detektering af NTRK-fusioner

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

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

Overensstemmelsesanalyserne, eksklusive og inklusive ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater, er vist i tabel 2. Ved udeladelse af 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 %).

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabel 80 NTRK-præcisionsstudie: PPA og NPA for TSO Comprehensive (EU)-analysen sammenlignet med resultater fra ortogonal metode til detektering af NTRK-fusioner

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

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

Klinisk bridging-studie for NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusionsdetektion

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

LT-metoder omfatter NGS, fluorescent-in-situ-hybridisering (FISH), polymerase kædereaktion (PCR) og nanostrengsanalyser. NTRK-fusioner (ETV6 NTRK3) blev udledt for patienter med infantil fibrosarcoma, som havde en dokumenteret ETV6-translokation identificeret af FISH. Hovedparten af de 235 larotrectinib-prøvepatienter med kendt NTRK-fusionsstatus er testet efter NGS-metoder.

Studierne NAVIGATE NCT02576431 og SCOUT NCT02637687 fortsætter med at søge deltagere. Pr. dataskæringsdatoen 15. juli 2019 var 279 patienter tilmeldt. Af de 279 patienter var 208 NTRK-fusionspositive. Af de 208 positive patienter dannede 164 larotrectinib ePAS4.

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

Prøveopgørelse

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Der var 279 patienter tilmeldt i larotrectinib-studierne pr. 15. juli 2019. Af disse havde 235 kendte NTRK-fusionsstatus som fastlagt af en LT-metode: 208 var positive og 27 var negative. For 44 patienter var NTRK-fusionsstatus ukendt, da test ikke var påkrævet for patienter egnede i dosiseskaleringsfasen for NCT02122913- og SCOUT NCT02637687-studierne. I det kliniske bridging-TSO Comprehensive (EU)-analysestudie var prøver fra larotrectinib-prøvepatienter tilmeldt pr 15. juli 2019 med kendt NTRK-fusionsstatus (208 positive patienter og 27 negative patienter) og de supplerende prøver fastlagt til at være NTRK-fusionsnegative efter repræsentative LT-metoder, egnede til dette studie.

Af de 208 positive larotrectinib-prøver havde 154 en prøve, som var tilgængelig for TSO Comprehensive (EU)-analysetest. Af disse havde 138 gyldige resultater. Femten (15) prøver var ugyldige på grund af fejlede kvalitetsmetrikker ved prøvesekventering, og en prøve blev ikke testet på grund af en protokolafvigelse. Af de 27 negative larotrectinib-prøver havde 24 en prøve, som var tilgængelig for test. Af disse havde 22 gyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater. To prøver var ugyldige på grund af fejlede kvalitetsmetrikker ved prøvesekventering.

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

Konkordansresultater

Overensstemmelse i TSO Comprehensive (EU)-resultater relativt til LT-metoderesultater med og uden ugyldige TSO Comprehensive (EU)-resultater vises i [Tabel 81](#).

Tabel 81 NTRK klinisk bridging-studie: Konkordans mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metoder til påvisning af NTRK-fusioner

Overensstemmelsesmål	Udeladelse af ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater		Medtagelse af ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater	
	% overensstemmelse (n/N)	95 % CI*	% overensstemmelse (n/N)	95 % CI*
PPA	89.1% (123/138)	82,7 % - 93,8 %	80,4 % (123/153)	73,2 % - 86,4 %
NPA	96.3% (235/244)	93,1 % - 98,3 %	82,7 % (235/284)	77,8 % - 87,0 %
OPA	93.7% (358/382)	90,8 % - 95,9 %	81,9 % (358/437)	78,0 % - 85,4 %

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Følsomhedsanalyse i forhold til manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater demonstrerede robustheden af overensstemmelsesanalysen. Manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater for LT NTRK-fusionspositive patienter (n = 70) blev tilskrevet ved hjælp af en logistisk regressionsmodel. Overensstemmelsesoverslag, herunder de tilskrevne værdier vises i [Tabel 82](#).

Tabel 82 NTRK klinisk bridging-studie: Konkordans mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metoder til påvisning af NTRK-fusioner, herunder tilskrevne værdier for LT-positive patienter med manglende TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater

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

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

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

Overensstemmelser mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT'er efter metodetype (f.eks. RNA NGS, FISH) vises i [Tabel 83](#).

Tabel 83 NTRK klinisk bridging-studie: Konkordans mellem TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metoder til påvisning af NTRK-fusioner efter LT-metodetype

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

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

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

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

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

Kliniske effektivitetsresultater

Inden for ePAS4'en lignede effektiviteten af larotrectinib i TSO Comprehensive (EU) positiv, LT positiv population (97 patienter, ORR=78,4 %, 95 % CI [68,8 %, 86,1 %]) effektiviteten af larotrectinib i den samlede ePAS4-population (164 patienter, ORR=72,6 %, 95 % CI [65,1 %, 79,2 %]) ([Tabel 84](#)). Af de 97 TSO Comprehensive (EU) positive patienter i ePAS4, havde 28 (28,9 %) patienter opnået en fuld reaktion/kirurgisk fuld reaktion, og 48 (49,5 %) patienter havde opnået en delvis reaktion.

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

Tabel 84 Klinisk bridging-studie: ORR for LT positive patienter efter 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
Bedste samlede reaktion, n (%)	Fuld reaktion	31 (18,9 %)	22 (22,7 %)	1 (7,7 %)
	Kirurgisk fuld reaktion	8 (4,9 %)	6 (6,2 %)	0
	Delvis reaktion	80 (48,8 %)	48 (49,5 %)	2 (15,4 %)
	Stabil sygdom	25 (15,2 %)	13 (13,4 %)	4 (30,8 %)
	Progressiv sygdom	13 (7,9 %)	6 (6,2 %)	5 (38,5 %)
	Kan ikke evalueres	7 (4,3 %)	2 (2,1 %)	1 (7,7 %)

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

		LT fusion positiv N=164	TSO Comprehensive (EU) positiv og LT positiv N=97	TSO Comprehensive (EU) negativ og LT positiv N=13
Samlet reaktionsfrekvens	Antal patienter, n	164	97	13
	Antal patienter med CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95 % CI*)	72,6 % (65,1 %, 79,2 %)	78,4 % (68,8 %, 86,1 %)	23,1 % (5,0 %, 53,8 %)

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

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

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

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

Referencer

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org.

Revisionshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200007789 v05	September 2022	Opdaterede tabeller for reproducerbarhed af studie 2.
Dokumentnr. 200007789 v04	Juni 2022	Tilføjet TSO Comprehensive Analysis Module v2.3.5 PNs. Fjernet TSO Comprehensive Analysis Module v2.3.3 PNs. Opdateret terminologi i afsnittet "Blindgrænse".

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200007789 v03	April 2022	Tilføjede oplysninger om ydeevnekarakteristik relateret til NTRK-fusioner. Tilføjet mærkning FOR EXPORT ONLY (KUN TIL EKSPORT). Opdateret erklæring om tilsigtet brug for at tilføje NTRK1-3 CDx-kravet. Udvidede produktkomponentoplysninger til at omfatter softwarekomponent-PN'er.
Dokumentnr. 200007789 v02	Februar 2022	Korrigerede fejl i tabelhenvisning. Tilføjede begrænsning relateret til kimcellevariationer og somatiske variationer. Præciserede sprog vedrørende detektering af genamplifikation.
Dokumentnr. 200007789 v01	December 2021	Opdaterede begrænsninger ved proceduren Præciserede specifikationerne for den magnetiske holder og termocyklere på listen over udstyr og materialer.
Dokumentnr. 200007789 v00	November 2021	Oprindelig udgivelse.

Patenter og varemærker

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

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

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

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

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

Indlægsseddel til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Kontaktoplysninger



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Produktmærkning

Se forklaringer på de symboler, der fremgår af produktemballagen og -mærkningen, i symbolnøglen på support.illumina.com under fanen *Documentation* (Dokumentation) for dit sæt.