

Pakningsvedlegg (EU)

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK
KUN FOR EKSPORT

Tiltenkt bruk

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

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

Tabell 1 Indikasjon for CDx

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

Oppsummering og forklaring av analysen

Klinisk beskrivelse

Kreft er en av de vanligste dødsårsakene over hele verden, og kreft kan oppstå i alle typer vev.¹ Analyse av det genetiske grunnlaget til en tumor er viktig for å identifisere pasienter som kan dra nytte av målrettede behandlinger og for å utvikle nye behandlingsmetoder. En rekke gener er implisert i tumordannelse eller -progresjon, og mange tumorer bærer en rekke varianter som påvirker disse genene og deres funksjoner. Disse variantene kan omfatte genmutasjoner som enkeltnukleotidvarianter (SNV-er), multinukleotidvarianter (MNV-er), insersjoner eller delesjoner, genamplifiseringer, genfusjoner og spleisevarianter. En annen konsekvens av tumorgenmutasjoner er presentasjon av neoantigener som frembringer tumorspesifikke immunreaksjoner. En tumors mutasjonsstatus kan representeres ved TMB og MSI, som er genomiske signaturer som er assosiert med forekomst av tumorneoantigen.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) er en test for neste generasjons sekvensering (NGS) med omfattende genomprofilerings (CGP) som gir en bred vurdering av genomiske varianter i et stort panel med kreftrelaterte gener oppført i [Tabell 2](#). Analysen detekterer små varianter i 517 gener pluss genamplifiseringer, fusjoner og spleisevarianter som angitt i [Tabell 2](#). Analysen gir kodesekvensdekning for alle gener unntatt TERT, der bare aktivatorregionen er dekket. Analysen vurderer også TMB-score og MSI-status. Disse analysemålene inkluderer innhold anført av profesjonelle organisasjoner, f.eks. European Society for Medical Oncology (ESMO) og andre viktige retningslinjer fra USA.² Uavhengige konsortiumpublikasjoner og farmasøytisk forskning på sent stadium påvirket også utformingen av TSO Comprehensive-analysen.

En liste over regionene som er utelatt fra variantbestemmelse, finnes i *Blokkeringsliste for TruSight Oncology Comprehensive* (dokumentnr. 200009524), som er tilgjengelig på Illuminas nettsted for kundestøtte.

Blokkeringslisten kalles svarteliste i noen filer.

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

Tabell 2 TSO Comprehensive (EU)-analysegenpanel

Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype
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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive

(EU)

Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype
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	INH1	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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive

(EU)

Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez ID	Gen	Varianttype
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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive

(EU)

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

Prosedyreprinsipper

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

TSO Comprehensive (EU)-analysen omfatter fire hovedprosesser.

- **Bibliotekklargjøring og anriking** – 40 ng totalt RNA omdannes til dobbelttrådet komplementært DNA (cDNA). 40 ng genomisk DNA (gDNA) skjæres i små fragmenter. Universelle adaptore for sekvensering liggeres på cDNA- og gDNA-fragmentene. Indekssekvensene P5 og P7 er integrert i hvert bibliotek for å gjøre det mulig å fange bibliotekfragmenter på overflaten av strømningscellen under sekvensering. Indeksene inkluderer en unik sekvens for å identifisere hver enkelt prøve, og når det gjelder biblioteker fra gDNA-prøver, individuelle molekyler ved hjelp av unike molekyloidifikatorer (UMI-er). Bibliotekene anrikes deretter for de spesifikke genene av interesse ved hjelp av en fangstbasert metode. Biotinylerte probesekvenser som dekker genregioner av interesse og målrettet for analysen hybridiseres til bibliotekene. Probene og de hybridiserte målrettede bibliotekene isoleres fra ikke-målrettede biblioteker ved fangst med streptavidinbelagte magnetiske partikler. De målrettede anrikede bibliotekene vaskes og forsterkes. Mengden av hvert anrikt bibliotek blir deretter normalisert ved hjelp av en kulebasert metode for å sikre lik representasjon av de poolede bibliotekene for sekvensering.
- **Sekvensering og primæranalyse** – Normaliserte, anrikede biblioteker slås sammen og klynges på en strømningscelle, og sekvenseres deretter ved hjelp av sekvensering ved syntese (SBS)-kjemi på NextSeq 550Dx. SBS-kjemi bruker en reversibel terminator-metode for å påvise enkle, fluorescensmerkede deoksynukleotidtrifosfat (dNTP)-baser idet de blir inkorporert i voksende DNA-tråder. Under hver sekvenseringssyklus tilsettes et enkelt dNTP i nukleinsyrekjeden. dNTP-etiketten fungerer som en terminator for polymerisering. Det fluorescerende fargestoffet avbildes etter hver dNTP-inkorporering for å identifisere basen og spaltes deretter for å muliggjøre inkorporering av det neste nukleotidet. Fire reversibel terminator-bundne dNTP-er (A, G, T og C) foreligger som separate enkeltmolekyler. Naturlig konkurranse begrenser derfor inkorporeringsavvik. Under primæranalysen foretas basebestemmelser direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekvenseringssyklus. Dette fører til base for base-sekvensering. En kvalitetsscore tilordnes hvert baseanrop.
- **Sekundæranalyse** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module ligger på NextSeq 550Dx-instrumentet som en del av Local Run Manager-programvaren for å legge til rette for TSO Comprehensive (EU)-kjøringsoppsettet og for å utføre sekundæranalyse av sekvenseringsresultater. Sekundæranalysen omfatter validering av kjøringsbehandling og kvalitetskontroll, etterfulgt av demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting og variantbestemmelse. Demultipleksing separerer data fra poolede biblioteker basert på de unike sekvensindeksene som ble lagt til under prosedyren for bibliotekklargjøring. Det genereres FASTQ-mellomfiler som inneholder sekvenseringsavlesningene for hver prøve og kvalitetsresultatene, unntatt avlesninger fra klynger som ikke passerte filtreringen. Sekvenseringsavlesningene innrettes deretter mot et referansegemot for å identifisere en relasjon mellom sekvensene, og blir tilordnet et resultat basert på lignende regioner. Sammenstilte avlesninger skrives til filer i BAM-format. Analyseprogramvaren bruker separate algoritmer for biblioteker generert fra DNA-

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

og/eller RNA-prøver for å betegne små DNA-varianter, genamplifiseringer, TMB og MSI for DNA-prøver og fusjoner og spleisevarianter for RNA-prøver. Flere utdata genereres av analyseprogramvaremodulen, herunder sekvenseringsmetrikk og Variant Call Format (VCF)-filer. VCF-filene inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegеном. Sekvenseringsmetrikk og individuelle utdatafiler genereres for hver prøve.

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

Prosedyremessige begrensninger

Kun til *in vitro*-diagnostisk bruk.

- Kun for bruk på resept. Testen skal brukes i henhold til forskrifter for kliniske laboratorier.
- Genomfunn som er oppgitt i [Tabell 2](#) under tiltenkt bruk, er ikke preskriptive eller konklusive for merket bruk av spesifikke terapeutiske produkter.
- Klinisk validering er ikke utført for varianter som er oppgitt i TSO Comprehensive (EU)-resultatrapporten under Genomfunn med dokumentert klinisk signifikans og Genomfunn med potensiell klinisk signifikans.
- Beslutninger om pasientomsorg og -behandling må baseres på den behandlende legens uavhengige medisinske vurdering, og der det er tatt hensyn til all relevant informasjon om pasientens tilstand, f.eks. pasient- og familieanamnese, fysiske undersøkelser, informasjon fra andre diagnostiske tester og pasientens preferanser, i henhold til standardbehandling i et gitt samfunn.
- FFPE-prøvekvalitet er svært varierende. Prøver som ikke gjennomgikk standard fikseringsprosedyrer, genererer kanskje ikke ekstraherte nukleinsyrer som oppfyller kvalitetskontrollkravene for analysen ([Kvalitetskontroll på side 78](#)). FFPE-blokker som har blitt oppbevart lenger enn fem år, har vist lavere gyldighet.
- Ytelsen til TSO Comprehensive (EU) i prøver tatt fra pasienter som har mottatt organ- eller vevstransplantasjon, er ikke evaluert.
- I svært omstrukturerte genomer med delesjoner og tap av heterozygositet kan TSO Comprehensive (EU)-programvare feilaktig klassifisere en DNA-prøve som kontaminert (CONTAMINATION_SCORE (Kontaminasjonscore) > 3106 og p-verdi > 0,049).
- Et negativt resultat utelukker ikke tilstedeværelse av en mutasjon under deteksjonsgrensene (LoD) for analysen.
- Sensitiviteten for deteksjon av små DNA-varianter kan påvirkes av:
 - Genomisk kontekst med lav kompleksitet
 - Økende variantlengde

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

- TMB-score kan være unøyaktige i følgende kontekster:
 - Når tumorinnhold når nivåer der kimbane og somatiske variantallfrekvenser (VAF-er) konvergerer.
 - I populasjoner som ikke er godt representert i offentlige databaser.
- Sensitiviteten for deteksjon av fusjoner kan påvirkes:
 - Ved lav bibliotekkompleksitet som fører til reduserte støtteavlesninger på grunn av avvik i analysearbeidsflyten (følg for eksempel blandetrinn i [Denaturere og renaturere RNA på side 44](#)).
 - Når et enkelt gen spenner over begge bruddpunkter.
 - I tilfeller der bruddpunkter for flere fusjoner er i umiddelbar nærhet av hverandre med én eller flere partnere. De flere bruddpunktene og partnerne kan rapporteres som ett enkelt bruddpunkt og én partner.
 - Av små mediane innsatsstørrelser. En minimum median innsatsstørrelse på 80 bp er påkrevd, men sensitivitet reduseres i området 80–100 bp.
 - Ved lav sekvenskompleksitet eller homolog genomisk kontekst rundt fusjonsbruddpunkter.
- Oppløsningen til genene som er involvert i en fusjon, kan påvirkes når fusjonsbruddpunkter oppstår i genomiske regioner som inneholder overlappende gener. Analysen vil rapportere alle gener, avgrenset med semikolon, hvis flere gener overlapper et bruddpunkt.
- Inkonsekvent dekning i TERT-aktivatorregionen kan resultere i No Result (Ingen resultater) på grunn av lav dybde.
- Kommentar- eller KB-feil kan forårsake et falskt positivt eller falskt negativt resultat, inkludert oppføring av en variant på feil nivå (mellom Genomfunn med dokumentert klinisk signifikans og Genomfunn med potensiell klinisk signifikans), eller kommentarinformasjonen i rapporten kan være feil. Det finnes tre mulige feilkilder:
 - TSO Comprehensive (EU)-variantkommentar. Det er en feilrate på ca. 0,0027 % basert på en analyse av 2 448 350 varianter fra COSMIC v92, og det er derfor liten mulighet for feil.
 - KB-feil på grunn av kurasjons- eller lagdelingsprosessen.
 - Relevansen av KB-innhold endres over tid. Denne rapporten vil gjenspeile kunnskapen på tidspunktet da KB-versjonen ble kuratert.
 - Ingen varianter som rapporteres i resultatene for CDx påvirkes av verken annoterings- eller kunnskapsbasefeil.
- TSO Comprehensive (EU) er utviklet for å rapportere somatiske varianter ved rapportering av varianter med evidens av klinisk betydning eller varianter med mulig klinisk betydning. Som test kun for tumorer er kimbanevariantrapportering (nedarvet) mulig, men utilsiktet. TSO Comprehensive (EU) bruker en KB til å rapportere varianter uten uttrykkelig å kommentere om de skriver seg fra kimbane eller har somatisk opprinnelse.
- KB inkluderer kun terapeutiske, diagnostiske og prognostiske tilknytninger som er relevante for varianter som er til stede i en etablert tumor. Tilknytninger med kreftrisiko eller mottakelighet tas ikke med i KB.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Produktkomponenter

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

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) Kit (Illumina-katalognr. 20063092) – Settet inneholder reagenser med tilstrekkelig volum til å generere 48 biblioteker (24 DNA-biblioteker og 24 RNA-biblioteker). Reagensvolumet står også for kontroller.
- Kunnskapsbase – oppdateres månedlig, og kan lastes ned fra Illumina Lighthouse-portalen.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module – en servicerepresentant fra Illumina installerer én av følgende tilgjengelige versjoner på NextSeq 550Dx-instrumentet:
 - Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina-katalognr. 20051843), som inneholder følgende komponenter og støtter 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) Analysis Module (Illumina-katalognr. 20051843), som inneholder følgende komponenter og støtter 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

Reagenser som følger med

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

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og nukleotider.	–25 °C til –15 °C

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter, DNA-polymerase, RNase H og nukleotider.	–25 °C til –15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og tilfeldige heksamere.	–25 °C til –15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Bufret vandig løsning som inneholder revers transkriptase.	–25 °C til –15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), PN 20031118

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Bufret vandig løsning som inneholder T4 DNA-polymerase og polynukleotidkinase.	–25 °C til –15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og nukleotider.	–25 °C til –15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter.	–25 °C til –15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Bufret vandig løsning som inneholder ligase.	–25 °C til –15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider for universell sekvensering.	–25 °C til –15 °C

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider for universell sekvensering.	–25 °C til –15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter.	–25 °C til –15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA-polymerase og nukleotider.	–25 °C til –15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), PN 20031119

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter.	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig løsning som inneholder magnetkuler.	2 °C til 8 °C
TE Buffer (TEB)	20031443	1	10 ml	Tris EDTA-løsning.	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

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

Merk Bruk unike indeksprimere (UPxx) til RNA- eller DNA-prøver.

Indeks- primer	Dele- nummer	Antall	Volum	i7- indeks	i7- sekvens	i5- indeks	i5- sekvens	Oppbevarings- 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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Indeks- primer	Dele- nummer	Antall	Volum	i7- indeks	i7- sekvens	i5- indeks	i5- sekvens	Oppbevarings- temperatur
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	ATTGAGAA	D501	AGGCTATA	-25 °C til -15 °C
UP08	20031452	1	24 µl	D713	GAATAATC	D502	GCCTCTAT	-25 °C til -15 °C
UP09	20031453	1	24 µl	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	-25 °C til -15 °C
UP10	20031454	1	24 µl	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	-25 °C til -15 °C
UP11	20031455	1	24 µl	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	-25 °C til -15 °C
UP12	20031456	1	24 µl	D701	ATTACTCG	D518	GACTTCCT	-25 °C til -15 °C
UP13	20031457	1	24 µl	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	-25 °C til -15 °C
UP14	20031458	1	24 µl	D714	ATGCGGCT	D512	TAGCCGCG	-25 °C til -15 °C
UP15	20031459	1	24 µl	D718	GCCTCTCT	D514	TTCGTAGG	-25 °C til -15 °C
UP16	20031460	1	24 µl	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

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



FORSIKTIG

Bruk kombinasjonsindeksprimere (CPxx) bare til DNA-prøver (FFPE-arbeidsflyt)

Indeks- primer	Dele- nummer	Antall	Volum	i7- indeks	Sekvens	i5- indeks	Sekvens	Oppbevarings- 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
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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), PN 20031123

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Bufret vandig løsning som inneholder formamid og salter	2 °C til 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og fastfase paramagnetiske kuler kovalent belagt med streptavidin	2 °C til 8 °C
2 N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroksidløsning	2 °C til 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Bufret vandig løsning	2 °C til 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler	2 °C til 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptetanol og formamid	2 °C til 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig løsning som inneholder magnetkuler	2 °C til 8 °C

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), PN 20031121

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevarings-temperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider	–25 °C til –15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	–25 °C til –15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Bufret vandig løsning som inneholder detergent	–25 °C til –15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA-polymerase og nukleotider	–25 °C til –15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Bufret vandig løsning som inneholder P5- og P7-primere	–25 °C til –15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkapttoetanol og formamid	–25 °C til –15 °C
PhiX-internkontroll (PhiX)	20031492	1	10 µl	Bufret vandig løsning som inneholder PhiX-genomisk DNA	–25 °C til –15 °C

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

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

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

Preamplifiseringsreagenser

- Reagenser for DNA- og RNA-ekstraksjon og -rensing – reagenskrav er angitt under [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23](#).
- DNA- og RNA-kvantifiseringsreagenser – reagenskrav er angitt under [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23](#).
- TruSight Oncology DNA Control (Illuminas katalognr. 20065041)
- TruSight Oncology RNA Control (Illuminas katalognr. 20065042)
- Etanol, 100 % (alkoholinnhold 200), molekylær biologisk kvalitet
- RNase-/DNase-fritt vann

Postamplifiseringsreagenser

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

Reagensoppbevaring og -håndtering

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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



FORSIKTIG

Ikke oppbevar reagensene på et frostfritt lager eller i dørrommene i kjøleskapet.

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

Eske	Delenummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Postamplifisering



FORSIKTIG

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

- Endringer i reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Reagensene må ikke brukes hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel endringer i reagensfarge eller klarhet).
- TSO Comprehensive (EU)-analysens stabilitet er evaluert, og ytelsen er demonstrert i opptil fire anvendelser av settet. Reagenser er stabile når de oppbevares i henhold til de angitte oppbevaringstemperaturene frem til utløpsdatoen som er spesifisert på etiketten på esken.

Utstyr og materiell

Nødvendig utstyr og materialer som ikke følger med

Utstyr og materiell til preamplifisering

Utstyr	Leverandør
Ultrasonikator med tilhørende tilbehør Se Optimalisering av ultrasonikatorer for å fragmentere DNA på side 21 .	Generell laboratorieleverandør

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Utstyr	Leverandør
Termosykler med følgende spesifikasjoner • Oppvarmet lokk som tåler å stilles på 30 °C og 100 °C (eller slås av hvis det ikke tåler 30 °C) • 4 °C til 100 °C temperaturområde • ±0,25 °C temperaturnøyaktighet • Kompatibel med 96-brønners PCR-plater, 0,2 ml (polypropylen)	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubatorer (2) med innsatser for 96-brønners MIDI-plater (2)	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Sentrifuge (platesentrifuge) med følgende egenskaper: • Sentrifugering av 96-brønners mikroplater • Kapasitet 280 x g	Generell laboratorieleverandør
Plateryster med følgende egenskaper: • 2 mm kretsløp • Kan ristes ved 1200 o/min og 1800 o/min	Generell laboratorieleverandør
Forseglingsskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: • Utformet for utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet, ikke bunnen • For 96-brønners MIDI-plater	Generell laboratorieleverandør
Presisjonsdråpetellere • 20 µl en- eller flerkanals dråpetellere • 200 µl en- eller flerkanals dråpetellere • 1000 µl en- eller flerkanals dråpetellere Som oppfyller følgende krav: • Kalibrert regelmessig til en nøyaktighet innenfor 5 %	Generell laboratorieleverandør
Dråpetellerhjelpemiddel	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Utstyr	Leverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: • Avrivbar, optisk klar polyester • Egnet til PCR-plater med kant eller delvis kant • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -40 °C til 110 °C • DNase-/RNase-fri	Generell laboratorieleverandør
1,7 ml mikrosentrifugeprøverør, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere (PVC, engangskar, 50 ml)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
20 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
200 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
1000 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)	Fisher Scientific, delenr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønners PCR-plater, 0,2 ml (polypropylen)	Generell laboratorieleverandør

Utstyr og materiell til postamplifisering

Utstyr	Leverandør
NextSeq 550Dx-instrumentet	Illumina, katalognr. 20005715
Sentrifuge (platesentrifuge) med følgende egenskaper: • Sentrifugering av 96-brønners mikroplater • Kapasitet 280 x g	Generell laboratorieleverandør

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Utstyr	Leverandør
Termosykler med følgende spesifikasjoner: • Oppvarmet lokk (100 °C) • 4 °C til 100 °C temperaturområde • ±0,25 °C temperaturnøyaktighet • Kompatibel med 96-brønners PCR-plater, 0,2 ml (polypropylen)	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator med innsats for 96-brønners MIDI-plater	Generell laboratorieleverandør
Tørrvarmeblokk som oppfyller følgende spesifikasjoner: • 25 °C til 99 °C temperaturområde • ±5 °C temperaturnøyaktighet	Generell laboratorieleverandør
Plateryster med følgende egenskaper: • 2 mm kretsløp • Kan ristes ved 1200 o/min og 1800 o/min	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Forseglingskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: • Utformet for utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet, ikke bunnen • For 96-brønners MIDI-plater	Generell laboratorieleverandør
Presisjonsdråpetellere • 20 µl en- eller flerkanals dråpetellere • 200 µl en- eller flerkanals dråpetellere • 1000 µl en- eller flerkanals dråpetellere Som oppfyller følgende krav: • Kalibrert regelmessig til en nøyaktighet innenfor 5 %	Generell laboratorieleverandør
Dråpetellerhjelpemiddel	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Utstyr	Leverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: • Avrivbar, optisk klar polyester • Egnet til PCR-plater med kant eller delvis kant • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -40 °C til 110 °C • DNase-/RNase-fri	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugeprøverør, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere (PVC, engangskar, 50 ml)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
20 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
200 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
1000 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)	Fisher Scientific, delenr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønners PCR-plater, 0,2 ml (polypropylen)	Generell laboratorieleverandør

Optimalisering av ultrasonikatorer for å fragmentere DNA

DNA-fragmentering eller -skjæring påvirker analyseytelsen ved å fastslå fordelingen av fragmentstørrelsen, som igjen påvirker sekvenseringsdekning. Flere fokuserte ultralydkonfigurasjoner ble evaluert og optimalisert for TSO Comprehensive (EU)-analysen ([Tabell 3](#)). Skjæretid ble justert for å maksimere MEDIAN_EXON_COVERAGE-metrikken som er skissert i delen Kvalitetskontroll. Skjæretiden (med fet skrift i [Tabell 3](#)) var forskjellig på tvers av konfigurasjoner, og det samme var MEDIAN_INSERT_SIZE-resultater. Alle tre konfigurasjoner ble testet med 8-strimlersrør. Brukte volumer vises i [Tabell 3](#).

Optimalisering av konfigurasjon 3 (punkttransduser, ikke-avgasset vann, lite vannbadvolum) brukte pulsering og hadde den korteste skjæretiden, noe som resulterte i en litt større fragmentstørrelsesfordeling sammenlignet med de to andre konfigurasjonene (MEDIAN_INSERT_SIZE var omtrent 5–10 basepar større). Videre trengte konfigurasjon 3 en økt DNA-innmating (50 ng) for å oppnå tilsvarende MEDIAN_EXON_

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

COVERAGE i forhold til de to andre konfigurasjonene, som brukte den nominelle 40 ng-innmatingen.

Konfigurasjon 3 har mer skade og/eller denaturering og derfor en redusert effektiv masse av dsDNA-molekyler som kan brukes til bibliotekklargjøring.

Det anbefales å sentrifugere skjæringsrørene under gjenfinningsprosessen for å sikre at det spesifiserte volumet gjenfinnes, ettersom tap av materiale kan påvirke ytelsen negativt.

Tabell 3 Evaluerte konfigurasjoner av fokusert ultrasonikator

Parameter	Konfigurasjon		
	1	2	3
Transduser	Linje	Punkt	Punkt
Vannbadvolum	5 l	5 l	85 ml
Vann avgasset	Ja	Ja	Nei
Vannkjøler	Ja	Ja	Ja
Vannbadtemperatur	7 °C	7 °C	12 °C
Største insidenseffekt (Peak Incident Power – PIP)	450 W	175 W	50 W
% nyttefaktor	30	10	30
Sykluser per puls	200	200	1000
Pulsering (pulser på 10 sek)	Nei	Nei	Ja
Skjæretid	250 s	280 s	200 s*
Prøvebehandling	1–8	1	1
Partistørrelse	1–96	1–96	1–8
Prøvestørrelse i 8-strimlers glassrør	130 µl	130 µl	50 µl
DNA-innmatingekvivalent (for median eksondekning)	40 ng	40 ng	50 ng

* Skjæretiden på 200 s består av pulser på 10 s med 20 repetisjoner.

Rampehastighet for termosykler

Termisk syklusrampehastighet påvirker analysens kvalitetskontrollmetrikk – MSI-steder som kan brukes, CNV-mål for median bin-telling, median innsatsstørrelse (RNA) – samt støtteavlesninger for spleisevarianter og fusjoner. Optimalisering av termisk syklusrampehastighet anbefales.

Prøvetaking, transport og oppbevaring

Følg standardprosedyre ved innsamling, transport, oppbevaring og behandling av tumorvevsprøver.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Vevskrav

TSO Comprehensive (EU)-analysen krever at 40 ng RNA og/eller 40 ng DNA ekstraheres fra FFPE-vev. Ved å bruke både RNA og DNA er det mulig å analysere alle påståtte varianttyper. Vev bør fikseres med formalinfiksativ som er egnet for molekylære analyser, f.eks. 10 % nøytralbufret formalin. Vev kan ikke avkalkes. Før TSO Comprehensive (EU)-analysen utføres, må vevsprøven undersøkes av en patolog for å kontrollere at den er hensiktsmessig for denne testen. Minst 20 % tumorinnhold (etter område) kreves for å detektere somatiske driver-mutasjoner. Minst 30 % tumorinnhold kreves for å detektere MSI høy. Tumorinnhold for genamplifiseringer og RNA-varianter avhenger av graden av amplifisering eller ekspresjon (se [Tumorinnhold på side 97](#)).

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

Store mengder nekrotisk vev ($\geq 25 \%$) kan forstyrre TSO Comprehensive (EU)-analysens evne til å detektere genamplifiseringer og RNA-fusjoner.

Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring

- Ekstraher RNA og DNA fra FFPE-vevsprøver ved hjelp av kommersielt tilgjengelige ekstraksjonssett. Forskjeller i ekstraksjonssett kan påvirke ytelsen. Se [Evaluerer av ekstraksjonssett for nukleinsyre på side 89](#).
- Oppbevar ekstrahert stam nukleinsyre i henhold til instruksjonene fra ekstraksjonssettets produsent.
- Unngå endringer i konsentrasjon over tid ved å måle DNA og RNA umiddelbart før bibliotekklargjøring starter. Kvantifiser RNA og DNA ved hjelp av en fluorometrisk kvantifiseringsmetode som bruker nukleinsyrebindende fargestoffer. Nukleinsyrekonsentrasjonen bør være gjennomsnittet av minst tre målinger.
- Analysen krever at 40 ng av hver RNA-prøve klargjøres i RNase-/DNase-fritt vann (ikke inkludert) med et endelig volum på 8,5 μl (4,7 ng/ μl).
- Analysen krever 40 ng av hver gDNA-prøve med en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon på 3,33 ng/ μl . Skjæring krever et endelig volum på 52 μl (0,77 ng/ μl) med minimum 40 μl TEB (følger med) brukt som fortynner.

Biblioteklagring

Biblioteker kan oppbevares på PCR-plater i 7 til 30 dager, avhengig av typen bibliotek (se [Tabell 4](#)).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Tabell 4 Biblioteklagringstider

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

Advarsler og forholdsregler

Sikkerhet

1. Noen komponenter i denne analysen inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Sikkerhetsdatablader (SDS) finnes på support.illumina.com/sds.html.
2. Håndter alle prøver som om de er smittefarlige.
3. Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakk ved håndtering av prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og analysereagensene.

Laboratorium

1. Sørg for at laboratoriet har en enveis arbeidsflyt for å hindre kontaminasjon. Preamplifiserings- og postamplifiseringsområder må ha dedikert utstyr og materiell (for eksempel dråpetellere, dråpetellerspisser, vortekser og sentrifuge). Hindre medrivning av amplifiseringsprodukt eller -probe ved å unngå å gå tilbake til preamplifiseringsområdet etter å ha gått inn i postamplifiseringsområdet.
2. Utfør Indeksering av PCR og anrikingstrinnet i et postamplifiseringsområde for å hindre overføring av amplifiseringsprodukt.
3. Bibliotekklargjøringsprosedyrene krever et RNase-/DNase-fritt miljø. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensemiddel. Bruk plast sertifisert til å være fri for DNase, RNase og humant genomisk DNA.
4. For postamplifiseringsprosedyrer må arbeidsflater og utstyr rengjøres grundig før og etter hver prosedyre med en nylaget løsning av 0,5 % natriumhypokloritt (NaOCl). La løsningen være i kontakt med overflatene i 10 minutter, og tørk deretter grundig rent med 70 % etyl eller isopropanol.
5. Bruk nukleasefrie mikrosentrifugeprøverør, plater, dråpetellerspisser og beholdere.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

6. Bruk kalibrert utstyr gjennom hele analysen. Kalibrer utstyret i henhold til hastighetene, temperaturene og volumene som er spesifisert i denne protokollen.
7. Bruk presisjonsdråpetellere til å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Kalibrer regelmessig i samsvar med produsentens spesifikasjoner.
8. Bruk følgende retningslinjer ved bruk av flerkanaIs dråpetellere:
 - Pipetter minst $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Kontroller at barrierespissene sitter godt og egner seg til den flerkanaIs dråpetellerens merke og modell.
 - Fest spissene med en rullende bevegelse for å kontrollere at alle spissenes festes like godt.
 - Aspirer i 90° vinkel, med like væskevolumer for alle spissene.
 - Kontroller etter dispenseringen at det ble dispensert væske fra hver spiss.
9. Bruk utstyr som er spesifisert for analysen, og still inn programmene i samsvar med instruksjonene.
10. Angitte temperaturer for termosykleren og mikroprøveinkubatoren angir reaksjonstemperatur, ikke nødvendigvis utstyrets fastsatte temperatur.

Analyse

1. Unngå krysskontaminasjon.
 - Følg god laboratoriepraksis ved håndtering av prøver og reagenser.
 - Bruk nytt engangs-laboratorieutstyr og nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser.
 - Bruk aerosolresistente spisser til å redusere risikoen for krysskontaminasjon.
 - Bruk en enveis arbeidsflyt ved overgang fra preforsterknings- til postforsterkningsområdet.
 - Håndter og åpne bare én indeksprimer om gangen. Sett hetten tilbake på hvert indeksrør umiddelbart etter bruk. Ekstra hetter er inkludert i settet.
 - Bytt hansker ofte og hvis de kommer i kontakt med indeksprimere eller prøver.
 - Fjern ubrukte indeksprimerrør fra arbeidsområdet.
 - Ikke returner reagensene til originalrør etter bruk med remserør, kar eller beholder.
 - Bland prøver med en dråpeteller, og sentrifuger platen når dette angis.
 - Bruk en mikroplaterister. Ikke roter platene.
2. Ikke bytt om analysekomponenter fra ulike reagenssettloter. Reagenssettloter identifiseres på reagenssettets eskeetikett og hovedlotark.
3. God laboratoriepraksis er nødvendig for å hindre at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumenter, prøver og biblioteker. Nuklease- og PCR-produktkontaminasjon kan gi unøyaktige og upålitelige resultater.
4. Riktig platetype er nødvendig for optimal analyseytelse og -oppbevaring. Følg plateoverføringsinstruksjonene i [Bruksanvisning på side 34](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

5. Dersom du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i bibliotekskvaliteten.
6. Med mindre et sikkert stoppunkt er spesifisert i [Bruksanvisning på side 34](#), går du umiddelbart videre til neste trinn.
7. Oppbevar analysereagensene eller -komponentene ved angitt temperatur i fastsatte preforsterknings- og postforsterkningsområder.
8. Ikke lagre reagensene på et frostfritt lager eller i dørrommene i kjøleskapet.
9. Reagenser som inneholder kuler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.
10. Ikke bruk reagenser som har vært oppbevart feil.
11. Ikke avvik fra blandings- og håndteringsprosedyrene for hvert reagens. Utilstrekkelig blanding eller for kraftig rotasjon av reagenser kan føre til mislykkede prøveresultater.
12. Klargjør nye hovedblandinger, og kast restvolumet etter bruk.
13. Klargjør alltid ny 80 % etanol med RNase-/DNase-fritt vann for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som kan påvirke resultatene. Kast 80 % etanol etter bruk i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser.
14. Overfør spesifisert eluatvolum. Dersom det overføres mindre enn spesifisert eluatvolum under elueringstrinnene, kan det påvirke resultatene.
15. Bruk følgende retningslinjer for ultrasonikatorer. Følg produsentens instruksjoner.
 - Plasser gDNA langsomt i ultrasonikatorrøret for å unngå å danne bobler. For mye bobler eller en luftspalte i skjæringsrøret kan føre til ufullstendig fragmentering.
 - Dispenser langsomt i ultrasonikatorrør, og unngå å sprute.
 - Væskefortrengning og prøvetap unngås hvis dråpetellerspissen ikke settes inn i bunnen av ultrasonikatorrøret når fragmentert DNA fjernes.
16. Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøveinngang.
17. Ikke bruk en beholder til å dispensere reagenser for trinn som krever at mindre enn 10 µl materiale tilsettes i hver prøvebrønn.
18. Bruk en P20-dråpeteller ved overføring av fragmentert gDNA-prøve fra ultrasonikatorrøret til Library Prep (LP)-platen.
19. Ikke kombiner UMI- og SUA1-adaptore.
20. Bruk SUA1-adaptore med RNA-prøver.
21. Bruk UMI-adaptore med DNA-prøver.
22. Tilordne forskjellige indeksprimere til hver bibliotekprøve for å identifisere hvert bibliotek unikt når det pooler for sekvensering på en enkelt strømningscelle.
23. Ikke kombiner indeksprimerne CPxx og UPxx i samme bibliotek.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

24. Uoverensstemmelser mellom prøvene og indeksprimerne forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tapt positiv prøveidentifisering. Angi prøve-ID-er og tilordne indekser i Local Run Manager før du starter bibliotekklargjøringen. Registrer prøve-ID-er, indeksering og platebrønnorientering for referanse under bibliotekklargjøringen.
25. Bruk kun UPxx-indekser til biblioteker fra RNA-prøver.
26. Bruk UPxx-indekser eller CPxx-indekser for biblioteker fra DNA-prøver.
27. Sekvenser 8 RNA-biblioteker og 8 DNA-biblioteker per strømningscelle. Se [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#).
28. Sekvenser minst tre biblioteker. Følg retningslinjene i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#).
29. Gå umiddelbart videre til vasketrinnet for å hindre kulepelletter i å tørke etter bindetrinnet i [Fange mål ett på side 59](#) og [Fange mål to på side 63](#).
30. Kontroller at alt 80 % etanol fjernes fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol kan påvirke resultatene.
31. Følg det spesifiserte antallet vasker angitt i [Bruksanvisning på side 34](#) for å sikre optimal analyseytelse.
32. Resuspender bibliotekkulepelletten for å oppnå konsekvent klyngetetthet på strømningscellen under prosedyren [Normalisere biblioteker på side 69](#).

Prosedyremessige merknader

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Termosyklerprogrammer

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

Forsegling av platen og fjerning av forsegling

- Alltid forsegle plater med en ny klebende plateforsegling. Forseglinger må ikke gjenbrukes.
- Forsegl platen ved å påføre klebedekselet sikkert på platen med en forseglingsskive eller -rull.
- Alltid forsegl den 96-brønners platen med en ny klebende plateforsegling før trinnene i protokollen følges.
 - Plateristingstrinn
 - Sentrifugeringstrinn
 - Termosyklertrinn
 - Hybridiseringer
 - Langtidsoppbevaring
- Sørg for at kantene og brønnene er forseglet for å redusere risiko for krysskontaminasjon og fordamping.
- Plasser platen på et flatt underlag før du langsomt fjerner forseglingen.
- Sentrifuger ved $280 \times g$ i 1 minutt før forseglingen brytes hvis det observeres væske eller kondens på forseglingen eller sideveggene på platebrønnene.
- Bruk klebende plateforseglinger som er effektive ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, og som egner seg til PCR-plater med kant eller delvis kant.

Utstyr

- Sørg for at laboratoriepersonellet er kjent med produsentens instruksjoner for å bruke og vedlikeholde alt utstyr før analysen startes.

Platetype og plateoverføringer

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

- Rist PCR-platene ved 1200 o/min.
- Rist MIDI-platene ved 1800 o/min.
- Følg produsentens instruksjoner for å sørge for at plateristeren holder platen sikkert.

Sentrifugering

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

Håndtere reagenser

- Sett lokk på alle reagensrørene umiddelbart etter bruk for å begrense fordamping og hindre kontaminasjon.
- Bring reagensene tilbake til den spesifiserte oppbevaringstemperaturen når de ikke lenger er nødvendige for en prosedyre.
- Følg reagensklargjøringen som er beskrevet før hvert prosedyreavsnitt i [Bruksanvisning på side 34](#).
- Klargjør nødvendig volum hovedblanding, elueringsblanding og 80 % etanol for det antallet prøver som behandles.
- Volumene i hovedblandings- og løsningsstabellene inneholder overskudd. Følgende viser beregninger av overdoseringsvolum.
 - [Tabell 13](#)
 - $\text{Volum FSM} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antall prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25).$
 - $\text{Volum RVT} = (0,8 \mu\text{l}) \times (\text{antall prøver} + \text{kontroller}) \times (1,25).$
 - [Tabell 19](#)
 - $\text{Volum med ERA1-B} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,20).$
 - $\text{Volum med ERA1-A} = (2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,20).$
 - [Tabell 26](#)
 - $\text{Volum med EE2} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364).$
 - $\text{Volum med HP3} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364).$
 - [Tabell 27](#)
 - $\text{Volum med EE2} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364).$
 - $\text{Volum med HP3} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364).$
 - [Tabell 32](#)
 - $\text{Volum med LNA1} = (38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (2,0).$
 - $\text{Volum med LNB1} = (6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (2,0).$

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

- [Tabell 33](#)
 - Volum med EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,25)$.
 - Volum med HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,25)$.

Adaptersett

- TSO Comprehensive (EU)-analysen omfatter UMI-adaptore og SUA1-adaptore.
- SUA1-adaptore er beregnet på bruk sammen med RNA-prøver, ikke DNA.
- UMI-adaptore er beregnet på bruk sammen med DNA-prøver, ikke RNA.

Håndtere kuler

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

- Kulepelleten må ikke forstyrres mens den er på magnetstativet.
- Vinkle dråpetellerspissene i bunnen av brønnene ved vask av kuler eller fjerning av supernatant for å unngå å skape et vakuum og trekke løsningen inn i dråpetellerspissfiltrene.

Springsskjema for laboratoriet

- *Springsskjema for laboratoriet for TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200009022)* inneholder en sjekkliste for protokolltrinnene.

Antall biblioteker og valg av indekser

Planlegg antall prøvebiblioteker og prøveindekser for sekvenseringskjøringen før kjøringssoppsettet. Følgende retningslinjer for prøvenummer omfatter positive kontroller, men utelukker kontroller uten mal (NTC-er). NTC-er kan imidlertid legges til strømningscellen som en ekstra prøve.

Vurder følgende veiledning for å bestemme hvor mange biblioteker som skal sekvenseres på én strømningscelle.

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

Bibliotektype	Minimum*	Maksimum
RNA	3	16
DNA	3	8

Optimal reagensbruk ved sekvensering av TSO Comprehensive (EU) på NextSeq 550Dx-instrumentet forutsetter at 8 RNA-biblioteker og 8 DNA-biblioteker sekvenseres.

Tabell 6 Kombinerte RNA- og DNA-biblioteker for TSO Comprehensive (EU)

Antall DNA-biblioteker	Antall RNA-biblioteker
8	8

Tilsett indeksprimeren i hvert prøvebibliotek under bibliotekklargjøringen. ***Bruk en ny indeksprimerblanding for hvert prøvebibliotek.*** Indeksprimere identifiserer hver prøve unikt, slik at bibliotekene kan pooleres sammen for sekvensering på én strømningscelle. (Kompatible indekskombinasjoner vises på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) under kjøringssoppsettet på Local Run Manager-programvaren.)

Kontroller at indeksprimerne som brukes sammen med prøvene, samsvarer med indeksene som velges for analyse med Local Run Manager. ***Uoverensstemmelser forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tap av positiv prøveidentifisering.***

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Når bare tre biblioteker sekvenseres, er følgende nødvendig:

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

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

TruSight Oncology Controls

TSO Comprehensive (EU) krever bruk av TruSight Oncology Controls, som består av TruSight Oncology DNA Control og TruSight Oncology RNA Control som positive kontroller. Inkluder TruSight Oncology DNA Control for hver DNA-sekvenseringskjøring og TruSight Oncology RNA Control for hver RNA-sekvenseringskjøring i en gitt bibliotekklargjøring (inkluder også kontroller for kombinerte DNA- og RNA-kjøringer). Det klargjøres en unik positiv kontroll per planlagt sekvensert kjøring.

Inkluder én NTC i hver RNA- og DNA-bibliotekklargjøring. NTC sekvenseres gjentatte ganger innen én bibliotekklargjøring. Følg retningslinjene nedenfor for TruSight Oncology Controls.

- Behandle positive kontroller og NCT (no template control) på samme måte som prøvene.
- Bruk TEB til DNA NTC.
- Bruk DNase-/RNase-fritt vann til RNA NTC.
- De positive kontrollene er inkludert i maksimumskravet for biblioteket.
- NTC-ene er ikke inkludert i minimumskravet for biblioteket.
- Bruk UP-indekser til NTC ved sekvensering av 3 biblioteker.
- Siden NTC-en sekvenseres gjentatte ganger, kan ikke de valgte indeksene for denne kontrollen gjentas i bibliotekklargjøringen.

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 7 Bibliotekklargjøring for én kjøring med seks pasientprøver

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

Tabell 8 Bibliotekklargjøring for tre kjøringer med 20 pasientprøver

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

Bruksanvisning

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

Arbeidsflyt for bibliotekklargjøring

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

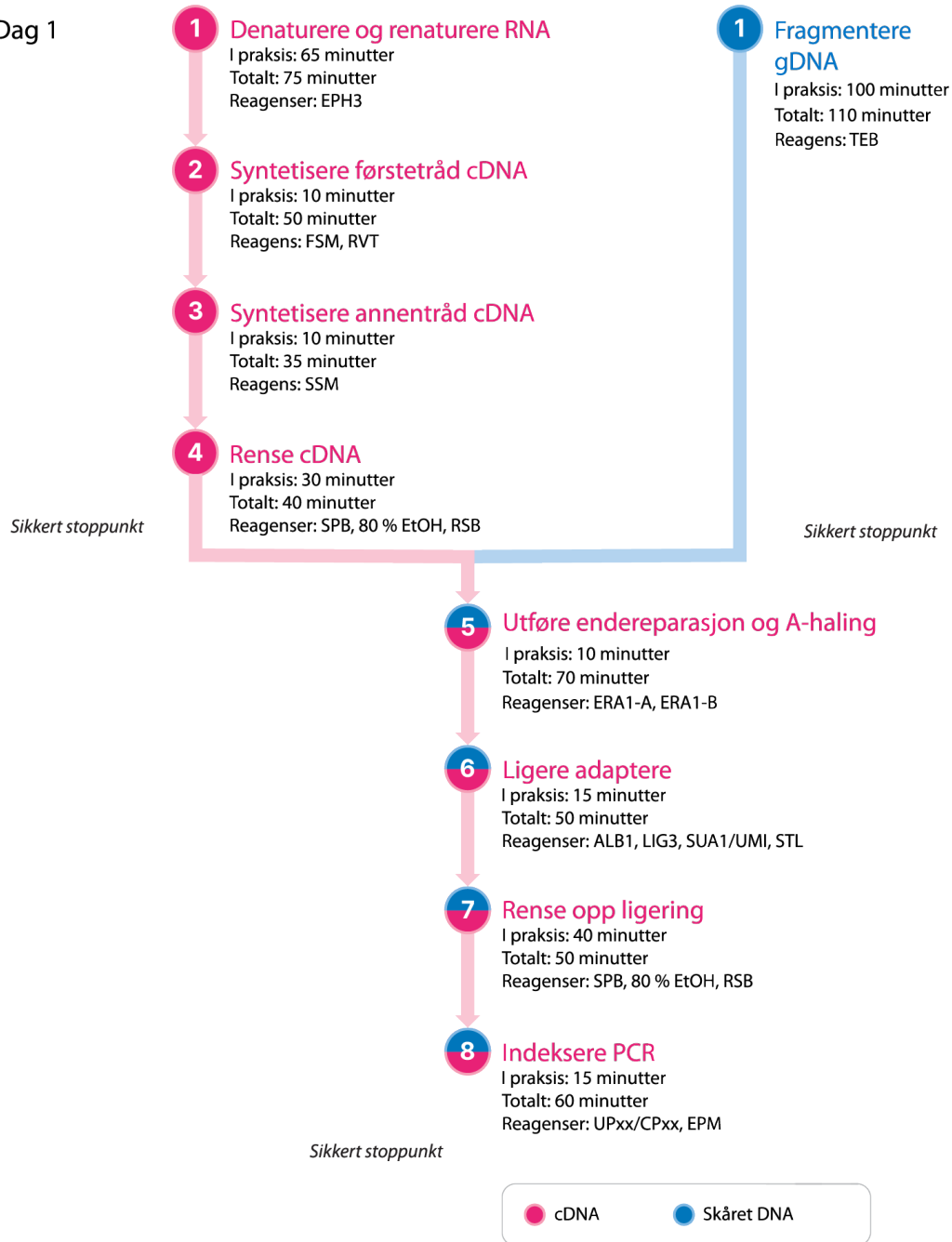
Før du starter protokollen oppgir du kjørings- og prøveinformasjon i et v2-prøveark som skal brukes med Local Run Manager-programvaren. Se [Oppgi kjøringsinformasjon på side 38](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

illumina®

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

Dag 1

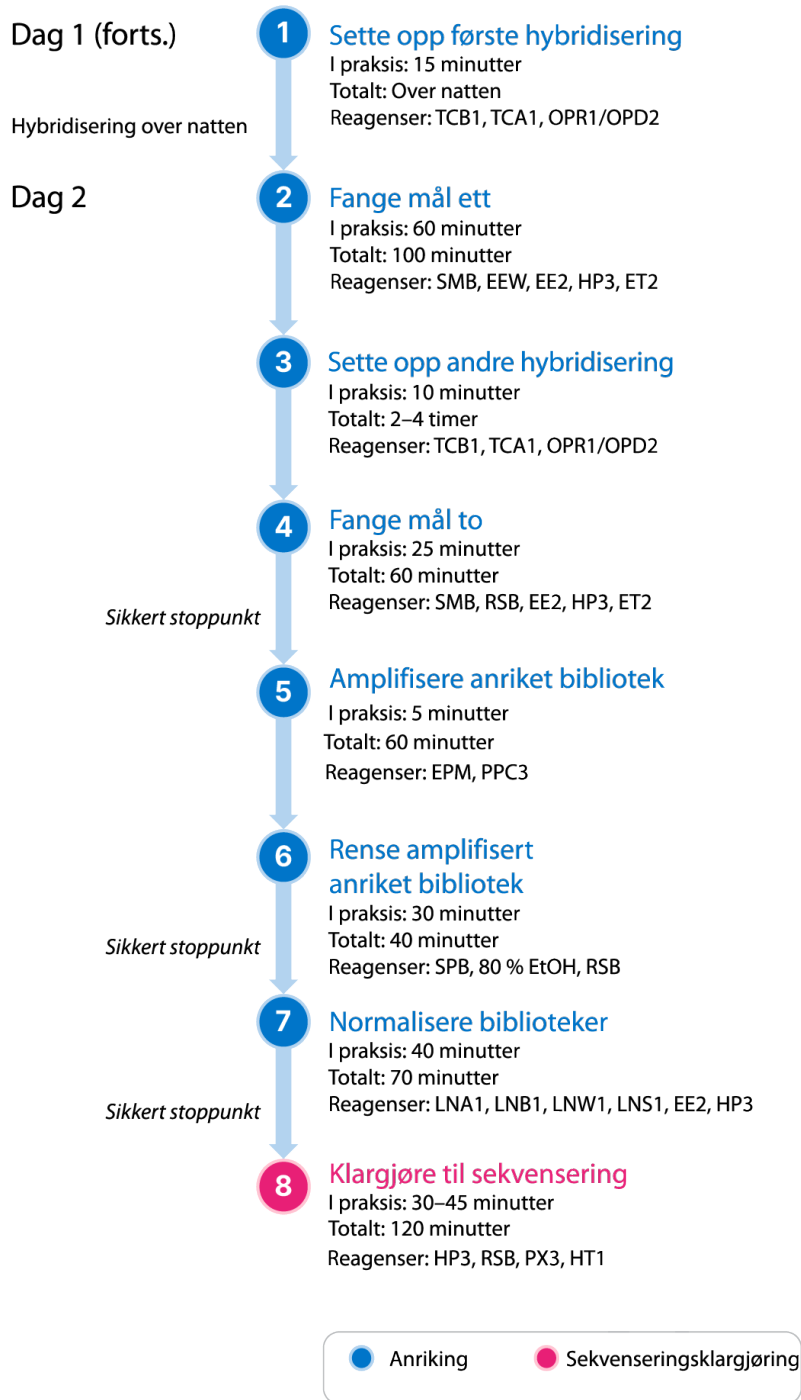


* I praksis-tider og samlede tider er omtrentlige.

Arbeidsflyt for anriking

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

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



Programmere termosyklere

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

Tabell 9 Termosyklarprogrammer for preamplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklarparametere
Denaturere og renaturere RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C i 5 minutter • 4 °C i 1 minutt • 4 °C hold
Syntetisere førstetråd cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C i 10 minutter • 42 °C i 15 minutter • 70 °C i 15 minutter • 4 °C i 1 minutt • 4 °C hold
Syntetisere annentråd cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C i 25 minutter • 4 °C i 1 minutt • 4 °C hold

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

Tabell 10 Termosyklarprogrammer etter amplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklarparametere
Indeksere PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 sykluser med: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • 10 °C hold
Utføre første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • 57 °C hold i 8 til 24 timer

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklusparametere
Utføre andre hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • 57 °C hold i 1,5 til 4 timer
Forsterke anriket bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 s • 18 sykluser med: • 98 °C i 10 s • 60 °C i 30 s • 72 °C i 30 s • 72 °C i 5 min • 10 °C hold

Oppgi kjøringsinformasjon

NextSeq 550Dx-instrumentet Local Run Manager er programvaren som brukes til å sette opp TSO Comprehensive (EU)-analysekjøringer. Du finner mer informasjon i *Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)*.

Angi informasjon om oppsett av kjøring og prøve direkte i TSO Comprehensive (EU) Analysis Module.

Angi kjøringsparametere

1. Logg på Local Run Manager på instrumentet eller fra en datamaskin i et nettverk.
2. Velg **Create Run** (Opprett kjøring), og velg deretter **TSO Comp (EU)**.
3. Skriv inn et kjøringsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til analyse. Følgende kriterier gjelder:
 - 1–40 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn, understrekingstegn eller bindestreker.
 - Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter understrekingstegn og bindestreker.
 - Unikt på tvers av alle kjøringer på instrumentet.
4. [Valgfritt] Angi en kjøringsbeskrivelse som gjør det lettere å identifisere kjøringen. Følgende kriterier gjelder:
 - 1–150 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn eller mellomrom.
 - Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter mellomrom.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Spesifisere prøvene for kjøringen

Spesifiser prøvene for kjøringen ved å velge ett av følgende alternativer.

- **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Se [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#) for alle støttede prøvekonfigurasjoner.
- **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstern fil i kommadelt CSV-format. En mal kan lastes ned på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).



FORSIKTIG

Misforhold mellom prøvene og indeksprimere fører til feil resultatrapportering pga. tap av positiv prøveidentifikasjon. Angi prøve-ID-er og tilordne indekser i Local Run Manager før du starter bibliotekklargjøringen. Registrer prøve-ID-er, indekser og platebrønnes retning for referanse under bibliotekklargjøringen.



FORSIKTIG

Unngå datatap ved å kontrollere at installasjon av kunnskapsbasen ikke pågår før du lagrer en kjøring.

Legge inn prøver manuelt

1. Angi en unik prøve-ID i feltet Sample ID (Prøve-ID). Følgende kriterier gjelder: **Alle kontrollprøver skal legges til først.** Mer informasjon finnes under [Kontrollprøver på side 41](#).
 - 1–25 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn, understrekingstegn eller bindestreker.
 - Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter understrekingstegn og bindestreker.
2. [Valgfritt] Angi en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse). Følgende kriterier gjelder:
 - 1–50 tegn.
 - Kun alfanumeriske tegn, bindestreker, understrekingstegn eller mellomrom.
 - Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter mellomrom, understrekingstegn og bindestreker.
3. Velg en indeks for DNA-biblioteket og/eller RNA-biblioteket som er klargjort fra prøven. Sørg for at RNA- og DNA-prøvene er i separate kolonner. Feltet for sekvens DNA i7+i5 fylles ut automatisk etter at du har valgt en DNA-indeks-ID. Feltet for sekvens RNA i7+i5 fylles ut automatisk etter at du har valgt en RNA-indeks-ID. Se [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#) for valg av indeks-ID i tillegg til denne oppsummeringen.
 - For et DNA-prøvebibliotek velger du en unik indeks-ID (UPxx- eller CPxx-indekser) fra rullegardinlisten DNA Index ID (DNA-indeks-ID).
 - For et RNA-prøvebibliotek velger du en unik indeks-ID (kun UPxx) fra rullegardinlisten RNA Index ID (RNA-indeks-ID).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

- Dersom det er tre biblioteker totalt i kjøringen, følg retningslinjene for valg av indeks i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#).
4. Bruk feltet Tumor Type (Tumortype) for å tilordne en tumortype for hver prøve. Velg den mest spesifikke tumortypen som er tilgjengelig. Se [Velge en tumortype på side 41](#).
 5. Bruk feltet Tumor Type (Tumortype) for å tilordne én av følgende kontrolltyper for hver kontroll. Se [Kontrollprøver på side 41](#).
 - DNA External Control (Ekstern DNA-kontroll)
 - RNA External Control (Ekstern RNA-kontroll)
 - DNA No-Template Control (DNA-kontroll uten mal)
 - RNA No-Template Control (DNA-kontroll uten mal)Hvis du bruker TruSight Oncology DNA Control, er kontrolltypen DNA External Control (Ekstern DNA-kontroll). Hvis du bruker TruSight Oncology RNA Control, er kontrolltypen RNA External Control (Ekstern RNA-kontroll).
 6. Tilordne kjønn.
 7. [Valgfritt] Velg **Export to CSV** (Eksporter til CSV) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
 8. Gjennomgå informasjonen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
Feil informasjon kan påvirke resultatene.
 9. Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

Importere prøver

1. Velg **Import CSV** (Importer CSV), og bla til plasseringen av prøveinformasjonsfilen. Det finnes to typer filer du kan importere.
 - Velg **Download CSV** (Last ned CSV) på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) for å laste ned en ny mal for prøveinformasjon. CSV-filen inneholder nødvendige kolonnetopptekster og format for import. Angi prøveinformasjon i hver kolonne for prøvene i kjøringen. Angi tumortypeterm eller tilknyttet kode for kolonnen Tumor Type (Tumortype) (se [Laste ned tumortyper på side 43](#)). Feltet Tumor Type (Tumortype) brukes også til å utpeke prøver som kontroller (se [Kontrollprøver på side 41](#)).
 - Bruk en fil med prøveinformasjon som ble eksportert fra Local Run Manager ved hjelp av funksjonen Export to CSV (Eksporter til CSV).
2. Gjennomgå den importerte informasjonen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
Feil informasjon kan påvirke resultatene.
3. [Valgfritt] Velg **Export to CSV** (Eksporter til CSV) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
4. Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Kontrollprøver

TSO Comprehensive (EU) krever bruk av TruSight Oncology Controls. Når en prøve angis som kontroll, settes Sex (Kjønn) for prøven automatisk som Unknown (Ukjent). Når du skal betegne en prøve som en kontroll, velger du én av fire kontrolltyper fra feltet Tumor Type (Tumortype):

- DNA External Control (Ekstern DNA-kontroll) (positiv RNA kontroll)
- DNA No-Template Control (DNA-kontroll uten mal)
- RNA External Control (Ekstern RNA-kontroll) (positiv RNA kontroll)
- RNA No-Template Control (RNA-kontroll uten mal)

Du finner mer informasjon om innstilling av tumortyper for alle typer prøver under kjøringssoppsettet under [Velge en tumortype på side 41](#).

Kun én av hver kontrolltype kan spesifiseres innenfor en kjøring. Bare et DNA-bibliotek kan spesifiseres for en ekstern DNA-kontroll eller en DNA-kontroll uten mal. Bare et RNA-bibliotek kan spesifiseres for en ekstern RNA-kontroll eller en RNA-kontroll uten mal. DNA- eller RNA-kontroller uten mal tas ikke med i beregningen av det maksimale antallet biblioteker i en kjøring.

Velge en tumortype

En tumortype må spesifiseres for hver prøve. Bortsett fra for kontrolltyper avledes de tilgjengelige tumortypene fra installert KB (Kunnskapsbase) og kan endres med oppdaterte versjoner av KB.



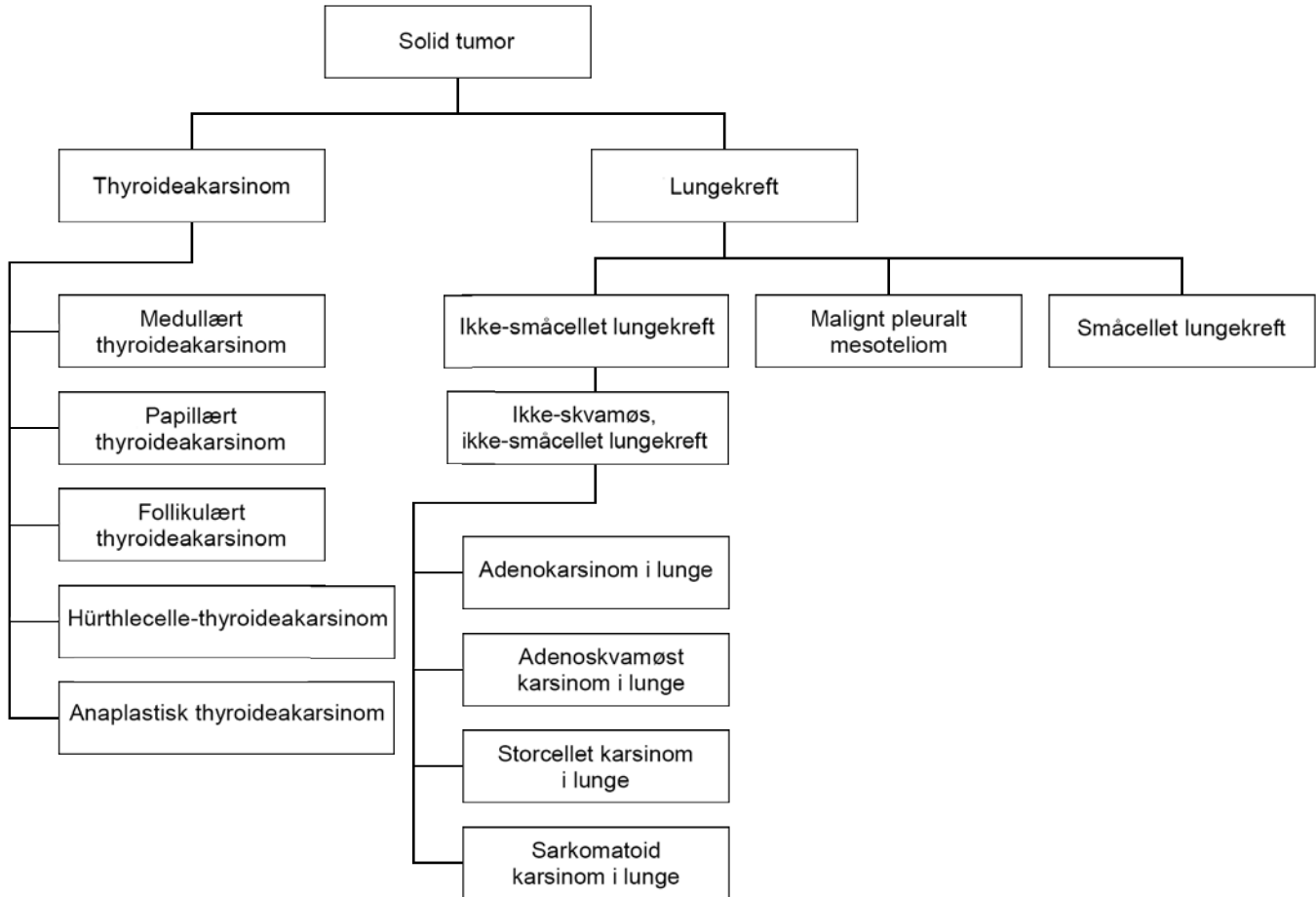
FORSIKTIG

Feil valg av tumortype kan gi feil resultater. Løs eventuelle advarsler som vises når du spesifiserer tumortyper, for å unngå analysefeil.

Tumortype-begrepene inngår i en hierarkisk sykdomsontologi i KB, som er konstruert som et sett med overordnede/underordnede relasjoner. For eksempel er begrepet «ikke-småcellet lungekreft» underordnet «lungekreft», ettersom ikke-småcellet lungekreft er en type lungekreft. [Figur 3](#) viser et delsett i en sykdomsontologi som eksempel. Her vises «solid tumor» som grunnbegrep og begrepene knyttet til lungekreft og skjoldbruskkjertelkreft (andre tumortyper vises ikke). Et begrep som er knyttet til et begrep på et lavere nivå gjennom en overordnet/underordnet relasjon, kalles et overordnet begrep. Det tilknyttede begrepet på lavere nivå er et underordnet begrep i forhold til det overordnede begrepet. For eksempel er «lungekreft» et overordnet begrep i forhold til «adenokarsinom i lunge» og «småcellet lungekreft», og «medullært thyroideakarsinom» er et underordnet begrep i forhold til både «thyroideakarsinom» og «solid tumor».

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Figur 3 Delsett av et eksempel på sykdomsontologi



Den valgte tumortypen for en pasientprøve påvirker:

- Hvilken tiltenkt bruk av CDx som evalueres for prøven. Kun pasientprøver med en tumortype som er i nøyaktig samsvar med, eller en underordnet tumortype for en tiltenkt bruk av CDx, blir evaluert for denne påstanden.
- Hvilke tumorprofileringsvarianter som inkluderes i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Instruksjonene nedenfor beskriver prosessen for å velge en tumortype via skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Tumortypen kan også angis ved å importere en CSV-fil som inneholder en tumortype (se [Importere prøver på side 40](#)).

1. Viser de tilgjengelige tumortypene ved å dobbeltklikke inne i tumortype-cellen i raden til prøven. Tilgjengelige tumortyper vises i en hierarkisk liste som er ordnet alfabetisk. Feltet Tumor Type (Tumortype) brukes også til å utpeke en kontrolltype for kontrollprøver (se [Kontrollprøver på side 41](#)).
2. Finn og velg ønsket tumortype ved hjelp av listen, eller bruk søkefeltet øverst i vinduet Tumor Type (Tumortype).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Laste ned tumortyper

En fullstendig liste over tilgjengelige tumortyper i TSV-format kan lastes ned fra skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) ved hjelp av knappen **Download Tumor Types TSV** (Last ned tumortyper TSV). Listen inneholder følgende informasjon:

- Tumortype-begrepet som er synlig i brukergrensesnittet.
- Den fullstendige banen til tumortypen innen tumortypehierarkiet (sykdomsontologi).
- Koden som Local Run Manager bruker for å identifisere tumortypen.

Klargjøring til protokolltrinn

1. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensmiddel.



FORSIKTIG

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

2. Angi termosyklusprogrammer for preamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
3. Følg produsentens instruksjoner for å sette opp ultrasonikatorene.
4. Dersom bare DNA-prøver prosesseres, gå direkte videre til [Fragmentere gDNA på side 48](#).
5. Ta RNA-kontrollene ut fra oppbevaring.
6. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

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

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

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

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

Denaturere og renaturere RNA

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

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:

- EPH3 – Legg til side.
- FSM – Bland ved å rotere. Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Inspiser for utfellinger. Hvis det forekommer utfellinger, bland ved å pipettere til utfellingene løser seg opp.
- RVT – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevares på is.

MERK RVT er en viskøs løsning. Alltid pipetter sakte for å unngå å danne bobler.

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

Tabell 13 FSM+RVT-hovedblanding

Hovedblandingskomponent	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 tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtere reagenser på side 29](#) for beregninger.

3. Bland ved å pipettere ti ganger.
4. Sett FSM+RVT-hovedblandingen på is til følgende bruk: [Syntetisere førstetråd cDNA på side 45](#).

Prosedyre

1. Tin ekstraherte RNA-prøver og RNA-kontroller på is.
Behandle RNA-kontroller som prøver for resten av protokollen.
2. Legg RNA-et på is når det ikke er i bruk. Se [Vevskrav på side 23](#) for å kvantifisere prøver.
3. Bland ved å pipettere hver RNA-prøve 10 ganger.
4. Bruk RNase-/DNase-fritt vann til å klargjøre 40 ng av hver RNA-prøve i et endelig volum på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
For RNA-kontroller må konsentrasjonen på røretiketten brukes.
5. Merk en ny 96-brønners PCR-plate CF (cDNA Fragments).
6. Tilsett 8,5 µl av hver RNA-prøve i en unik brønn på CF PCR-platen.
7. Kontroller at prøveplateoppsett og indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i Local Run Manager under kjøringsoppsettet.
8. Bland ved å rotere EPH3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

9. Tilsett 8,5 µl EPH3 i hver prøvebrønn.
10. Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.



FORSIKTIG

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.

11. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
12. Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
13. Plasser på termosykleren, og kjør LQ-RNA programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
14. Når prøvene når 4 °C, må du vente i ett minutt og deretter gå umiddelbart videre til neste trinn.

Syntetisere førstetråd cDNA

Denne prosessen sikrer revers transkripsjon av RNA-fragmentene som er primet med tilfeldige heksamerer til førstetrådet cDNA ved hjelp av revers transkriptase.

Prosedyre

1. Ta CF PCR-platen ut av termosykleren.
2. Pipetter 5 ganger for å blande FSM+RVT-hovedblandingen.
3. Tilsett 8 µl FSM+RVT-hovedblanding i hver prøvebrønn.
4. Pipetter for å blande 5 ganger.
5. Kast gjenværende FSM+RVT-hovedblanding.
6. Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
7. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
8. Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
9. Plasser på en termosyklere, og kjør 1stSS-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
10. Gå umiddelbart videre til neste trinn når prøvene når 4 °C.
Førstetrådprøver kan holdes ved 4 °C i opptil 5 minutter.

Syntetisere annentråd cDNA

Denne prosessen fjerner RNA-malen og syntetiserer dobbelttrådet cDNA.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagens:
 - SSM – Bland ved å vende 10 ganger. Sentrifuger et kort øyeblikk.

Prosedyre

1. Ta CF PCR-platen ut av termosykleren.
2. Tilsett 25 µl SSM i hver prøvebrønn.
3. Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
4. Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
5. Sentrifuger ved $280 \times g$ i 1 minutt.
6. Plasser på en termosyklus, og kjør 2ndSS-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
7. Når prøvene når 4 °C, må du vente i ett minutt og deretter gå umiddelbart videre til neste trinn.

Rense cDNA

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

Klargjøring

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

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Prosedyre

Binde

1. Ta CF PCR-platen ut av termosykleren.
2. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
3. Tilsett umiddelbart 90 µl SPB i hver prøvebrønn på BIND1 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,05 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.
4. Overfør hele volumet (50 µl) av hver prøve fra CF PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND1 MIDI-platen.
5. Kast den tomme CF PCR-platen.
6. Påfør klebende plateforsegling på BIND1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
7. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
8. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
9. Plasser BIND1 MIDI-platen på et magnetstativ i 5 minutter.
10. Bruk et P200-dråpetellersett satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kast all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en *andre* gang.
3. Fjern rester av EtOH fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

1. Ta BIND1 MIDI-platen ut av magnetstativet.
2. Bland ved å vende eller rotere RSB.
3. Tilsett 22 µl RSB i hver prøvebrønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på BIND1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

5. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuber i romtemperatur i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate PCF (Purified cDNA Fragments (rensede cDNA-fragmenter)).
Dersom du stopper ved [SIKKERT STOPPUNKT på side 48](#), skal du bruke en PCR-plate.
9. Overfør 20 µl eluat fra hver prøvebrønn på BIND1 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PCF-platen.
10. Kast den tomme BIND1 MIDI-platen.
11. Tilsett 30 µl RSB i hver prøvebrønn på PCF-platen.
12. Pipetter for å blande 10 ganger.
13. Påfør klebende plateforsegling på PCF-platen, og oppbevar den på is.
14. Sett EPH3, FSM, RVT og SSM tilbake til oppbevaring.
15. Gå videre til [Utføre endereparasjon og A-haling på side 51](#) hvis du behandler prøver avledet fra kun RNA (cDNA) og ikke stopper ved det sikre stoppunktet.

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjøring til protokolltrinn

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

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

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

Fragmentere gDNA

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

Klargjøring

1. Følg anbefalingene i [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23](#) for å kvantifisere prøver.
2. Klargjør følgende reagens:
 - TEB – Bland ved å vende eller rotere.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Prosedyre

Klargjøre platen

1. Velg ett av følgende tre alternativer for å klargjøre platen.
 - **Alternativ 1:** Behandle gDNA-prøvene samtidig med cDNA-prøvene på PCF MIDI-platen.
 - a. Merk PCF MIDI-platen LP (Library Preparation).
 - b. Legg på is, og sett til side til følgende bruk: [Overføre fragmentert DNA på side 50](#).
 - **Alternativ 2:** Behandle gDNA-prøvene samtidig med cDNA-prøvene, og PCF PCR-platen er fryst.
 - a. Tin PCF PCR-platen til romtemperatur.
 - b. Sentrifuger ved $280 \times g$ i 1 minutt.
 - c. Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - d. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Library Preparation).
 - e. Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen til tilsvarende brønn på LP MIDI-platen.
 - f. Kast PCF PCR-platen.
 - g. Påfør klebende plateforsegling, og legg på is for følgende bruk: [Overføre fragmentert DNA på side 50](#).
 - **Alternativ 3:** Behandle prøver som bare inneholder gDNA.
 - a. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Library Preparation).
 - b. Dersom du stopper ved [SIKKERT STOPPUNKT på side 50](#), skal du bruke en PCR-plate.
 - c. Dekk til og sett til side til følgende bruk: [Overføre fragmentert DNA på side 50](#).

Fortynne gDNA

1. Tin gDNA-prøvene og DNA-kontrollene ved romtemperatur.
Behandle DNA-kontroller som prøver for resten av protokollen.
2. Bland ved å pipettere hver gDNA-prøve 10 ganger.
3. Sentrifuger røret et kort øyeblikk for å samle opp dråper.
4. Bland ved å vende eller rotere TEB.
5. Bruk TEB til å klargjøre hver gDNA-prøve i et endelig volum på 52 µl (0,77 ng/µl). Informasjon om innmatingsmengder og minimumskonsentrasjoner basert på prøvetype finnes i tabellen som følger.
Analysen krever en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon for å tillate minst 40 µl TEB av 52 µl-volumet.
For DNA-kontroller må konsentrasjonen på røretiketten brukes. Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøve i denne fortynningen for å hindre prøvetap.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Prøvetype	Innmatingsmengde (ng)	Minimumskonsentrasjon (ng/μl)
FFPE	40	3,33

Fragmentere

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



FORSIKTIG

Plasser gDNA langsomt i røret, og kontroller at det ikke er bobler i røret, og at det ikke er luftspalter i bunnen av røret. Du finner mer informasjon under [Analyse på side 25](#) og i produsentens instruksjoner.

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

Overføre fragmentert DNA

1. Sørg for at prøveplateoppsettet og indeksene for hver prøve samsvarer med kjøringen du velger for analyse med TSO Comprehensive (EU) Analysis Module.
2. Følg ultrasonikatorprodusentens instruksjoner for å hente ut prøven.
For noen ultrasonikorrørtyper kan det være nødvendig med sentrifugering for å konsolidere prøven i røret.
3. For hver fragmentert gDNA-prøve brukes en p20-dråpeteller med tynne spisser til å utføre tre overføringer av 16,7 μl til en tom brønn på LP MIDI-platen.
4. Påfør klebende plateforsegling på LP MIDI-platen.

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjøring til protokolltrinn

Kontroller at det er angitt termosyklusprogrammer for postamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 37](#).

1. Klargjør en isbøtte.
2. Ta reagensrøret ut av esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 15 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (PN 20031118)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
ERA1-A	–25 °C til –15 °C	Oppbevares på is.	Utføre endereparasjon og A-haling

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

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

Tabell 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (PN 20031119)

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

Tabell 17 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (PN 20031120)

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

Tabell 18 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (PN 20031126)

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

Utføre endereparasjon og A-haling

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

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

Klargjøring

- Forvarm 2 mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokkinnsetser på følgende måte:
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

2. Klargjør følgende reagenser:

- ERA1-A – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevares på is.
- ERA1-B – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Inspiser for utfellinger. Dersom det forekommer utfellinger, varm røret til 37 °C, og bland ved å pipettere, til utfellingene løses opp.

3. Klargjør ERA1-hovedblandingen i et mikrosentrifugerør.

Tabell 19 ERA1-hovedblanding

Hovedblandings-komponent	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 tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtere reagenser på side 29](#) for beregninger.

4. Bland ved å pipettere sakte 10 ganger, sentrifuger et kort øyeblikk, og legg deretter ERA1-hovedblandingen på is.
5. Velg det egnede alternativet av de to følgende alternativene for å klargjøre platen.
 - **Alternativ 1:** Hvis det er prøver i en MIDI-plate.
 - a. Merk MIDI-platen på nytt LP2 (Library Preparation 2).Dersom noen prøver finnes i separate MIDI-plater, må alle prøvene flyttes til separate brønner på samme MIDI-plate i samsvar med plateoppsettet.
 - **Alternativ 2:** Hvis platen er fryst.
 - a. Tin PCF PCR-platen eller LP PCR-platen til romtemperatur.
 - b. Sentrifuger platen ved 280 × g i 1 minutt.
 - c. Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - d. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP2 (Library Preparation 2).
 - e. Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen eller LP PCR-platen til tilsvarende brønn på LP2 MIDI-platen.
 - f. Kast PCF PCR- eller LP PCR-platen.

Prosedyre

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

Ligere adaptore

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

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

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

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:

- ALB1 – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- LIG3 – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevares på is.
- SUA1 – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- UMI – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- STL – Legg til side for bruk i prosedyren.

Prosedyre

1. Fjern LP2 MIDI-platen fra isen.
2. Tilsett 60 µl ALB1 i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen. Pipetter langsomt.
3. Tilsett 5 µl LIG3 i hver prøvebrønn.
4. Tilsett adaptore.
Ikke kombiner forskjellige typer adaptore.
 - **RNA-prøvebrønner** – 10 µl SUA1 (blå hette) i hver prøve fra RNA.
 - **DNA-prøvebrønner** – 10 µl UMI (hvit hette) i hver prøve fra DNA.
5. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Inkuberes ved romtemperatur i 30 minutter.
8. Bland ved å rotere STL, og sentrifuger deretter kort.
9. Tilsett 5 µl STL i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen.
10. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
11. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.

Rense opp ligering

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

Klargjøring

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

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

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

Prosedyre

Binde

1. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
2. Tilsett umiddelbart 112 µl SPB i hver prøvebrønn i LP2 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,05 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.
3. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
4. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
5. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
6. Plasser LP2 MIDI-platen på magnetstativet i 10 minutter.
7. Bruk et P200-dråpetellersett satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver prøvebrønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kast all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
2. Vask kulene en *andre* gang.
3. Fjern rester av EtOH fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

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

Indeksere PCR

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

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - EPM – Oppbevares på is.
 - UPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger et kort øyeblikk. UPxx er indeksprimeren som ble valgt på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøningsoppsettet.
 - CPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger kort. CPxx er indeksprimeren som ble valgt på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøningsoppsettet.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

2. Kontroller at indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt på Local Run Manager under kjøringsoppsettet. Følg instruksjonene for valg av indeks i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#).



FORSIKTIG

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

Prosedyre

1. Tilsett 5 µl av den relevante indeksprimeren (UPxx eller CPxx) i den tilsvarende prøvebrønnen i LS PCR-platen i samsvar med de valgte indeksene.



FORSIKTIG

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

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



FORSIKTIG

Utfør alle etterfølgende trinn i et postforsterkningsområde for å hindre overføring av forsterkningsproduktet.

7. Sentrifuger LS PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
8. Plasser på den forhåndsprogrammerte termosykleren for postforsterkning, og kjør I-PCR-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).

MERK Følg instruksjon for tining for reagenser i Klargjøre protokoll-trinnene hvis du fortsetter med [Sette opp første hybridisering på side 57](#).

9. Sentrifuger LS CR-platen ved 280 × g i 1 minutt når I-PCR-programmet er avsluttet.
10. Merk platen på nytt ALS (Amplified Library Samples).

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, oppbevar ALS PCR-platen ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.

Klargjøring til protokolltrinn

1. Kontroller at det er angitt termosyklusprogrammer for postamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
2. Ta reagensrøret ut av esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

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

Tabell 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

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

Tabell 22 TruSight Oncology Comp Content Set Box (PN 20031122)

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

Sette opp første hybridisering

Under denne prosessen hybridiserer en gruppe oligoer til cDNA-biblioteker, og en gruppe oligoer hybridiserer til gDNA-biblioteker som er klargjort i henhold til [Indeksere PCR på side 55](#). Anriking av målrettede områder krever to hybridiseringstrinn. I den første hybridiseringen hybridiserer oligoer til cDNA- og/eller gDNA-biblioteker over natten (8 timer til 24 timer).

Klargjøring

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

2. Tin ALS PCR-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger ved $280 \times g$ i 1 minutt. Bland ved å pipettere.
3. Merk en ny 96-brønners PCR-plate HYB1 (Hybridization 1).

Prosedyre

1. Overfør 20 µl av hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-platen til tilsvarende brønn på HYB1 PCR-platen.
2. Påfør klebende plateforsegling på ALS PCR-platen, og sett den til side.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
3. Inspiser TCB1 for utfellinger. Varm røret igjen, og roter det til eventuelle krystaller løses opp.
4. Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
5. Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
6. Tilsett prober.
Ikke kombiner forskjellige typer prober. Tilsett bare ett probesett per brønn.
 - RNA-bibliotekbrønner – 5 µl OPR1 (rød hette) i hvert bibliotek fra RNA.
 - TSO Comprehensive (EU)-bibliotekbrønner for DNA – 5 µl OPD2 (hvit hette) i hvert bibliotek fra DNA for TSO Comprehensive (EU)-anriking.
7. Påfør klebende plateforsegling på HYB1 PCR-platen.



FORSIKTIG

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.

8. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
9. Plasser på termosykleren, og kjør HYB1-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
10. Hybridiser ved 57 °C i minst 8 timer til maksimalt 24 timer.
11. Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.
12. Oppbevar ALS PCR-platen ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.

Klargjøring til protokolltrinn

1. Ta reagensrøret ut av esken på begynnelsen av dag 2, og følg instruksjon for tining.

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
ET2	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to Normalisere biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål to Rense forsterket anrikt bibliotek

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

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

Tabell 25 Assay Content Set Box (PN 20031122)

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

Fange mål ett

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

Klargjøring

1. Forvarm en mikropørveinkubator med MIDI-varmeblokkinnsett til 57 °C.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

2. Klargjør følgende reagenser:

- EEW – Roter for å blande i 1 minutt.
- EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- SMB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - Sørg for å bruke **SMB**, ikke SPB, til denne prosedyren.
- ET2 – Legg til side for bruk i prosedyren.

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

Tabell 26 EE2+HP3-elueringsblanding for Fange mål ett

Elueringsblandings-komponent	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 tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtere reagenser på side 29](#) for beregninger.

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

Prosedyre

Binde

1. Ta HYB1 PCR-platen ut av termosykleren.
2. Sentrifuger HYB1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
3. Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
4. Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.

Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SMB er tilsatt i hver prøvebrønn.
5. Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra HYB1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP1 MIDI-platen.
6. Kast den tomme HYB1 PCR-platen.
7. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
8. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
9. Inkuber i den forvarmede mikroprøveinkubatoren ved 57 °C i 25 minutter.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

10. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
11. La CAP1 MIDI-platen stå på magnetstativet, og bruk et P200 µl dråpetellersett til 200 µl til å fjerne og kaste all supernatant uten å forstyrre kulepelleten.



FORSIKTIG

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

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Ta CAP1 MIDI-platen ut av magnetstativet.
 - b. Tilsett 200 µl EEW i hver brønn.
 - c. Sett dråpetellervolumet til 150 µl, og bland ved å pipettere minst 10 ganger. Kontroller at alle kulene resuspenderes.



FORSIKTIG

Kontroller at det ikke er noen kulepelleter ved å aspirere den samlede kuleløsningen i brønnen forsiktig til spissen. Se deretter på bunnen av hver brønn etter en pellet. Vinkle dråpetellerspissen mot kulepelleten under vasketrinnene for å løsne pelleten. Kontroller at kulepelleten er helt omgitt av oppløsningen. Løsningen bør se mørkebrun ut og ha en homogen konsistens.

- d. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
 - e. Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
 - f. Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
 - g. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
 - h. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
 - i. Oppbevar på magnetstativet, og fjern og kast all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
2. Vask kulene en *andre* gang.
3. Vask kulene en *tredje* gang.
4. Fjern rester av supernatant fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.

Eluere

1. Ta CAP1 MIDI-platen ut av magnetstativet.
2. Roter ny EE2+HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
3. Tilsett 17 µl EE2+HP3-elueringsblanding forsiktig i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
4. Kast gjenværende EE2+HP3-elueringsblanding.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

5. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-plate ELU1 (Elution 1).
9. Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
10. Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU1 PCR-platen.
11. Overfør 15 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU1 PCR-platen.
12. Kast den tomme CAP1 MIDI-platen.
13. Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
14. Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
15. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
16. Sett EEW tilbake til oppbevaring.

Sette opp andre hybridisering

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

Klargjøring

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

Prosedyre

1. Inspiser TCB1 for utfellinger. Dersom utfellinger, varm opp røret igjen og roter til krystallene løser seg opp.
2. Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på ELU1 PCR-platen.
3. Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

4. Tilsett prober.
Ikke kombiner forskjellige typer prober.
 - RNA-bibliotekbrønner – 5 µl OPR1 (rød hette) i hvert bibliotek fra RNA.
 - TSO Comprehensive (EU)-bibliotekbrønner for DNA – 5 µl OPD2 (hvit hette) i hvert bibliotek fra DNA for TSO Comprehensive (EU)-anriking.
5. Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
6. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på en termosyklus, og kjør HYB2-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).
8. Hybridiser ved 57 °C i minst 1.5 timer til maksimalt 4 timer.
9. Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.

Fange mål to

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

Klargjøring

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

Tabell 27 EE2+HP3-elueringsblanding for Fange mål to

Elueringsblandings-komponent	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 tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtere reagenser på side 29](#) for beregninger.

4. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 65](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

5. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP2 (Capture 2).
6. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Ta ELU1 PCR-platen ut av termosykleren.
2. Sentrifuger ELU1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
3. Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
4. Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SMB er tilsatt i hver prøvebrønn.
5. Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra ELU1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP2 MIDI-platen.
6. Kast den tomme ELU1 PCR-platen.
7. Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
8. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
9. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.

MERK Følg instruksjon for tining for reagenser i avsnittet Klargjøre til protokolltrinn hvis du fortsetter med [Forsterke anriket bibliotek på side 66](#).

10. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
11. La CAP2 MIDI-platen stå på magnetstativet, og bruk et P200-dråpetellersett til 200 µl til å fjerne og kaste all supernatant fra hver bibliotekbrønn uten å forstyrre kulepelleten.



FORSIKTIG

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

Vaske

1. Ta CAP2 MIDI-platen ut av magnetstativet.
2. Bland ved å vende eller rotere RSB.
3. Tilsett 200 µl RSB i hver brønn.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

4. Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
5. Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
6. Plasser på magnetstativet i 2 minutter.
7. La CAP2 MIDI-platen stå på magnetstativet, og fjern og kast all supernatant uten å forstyrre kulepelleten.
8. Fjern rester av supernatant fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.

Eluere

1. Ta CAP2 MIDI-platen ut av magnetstativet.
2. Roter ny EE2+HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
3. Tilsett 22 µl EE2+HP3-elueringsblanding i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
4. Kast gjenværende EE2+HP3-elueringsblanding.
5. Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-plate ELU2 (Elution 2).
9. Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
10. Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU2 PCR-platen.
11. Overfør 20 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU2 PCR-platen.
12. Kast den tomme CAP2 MIDI-platen.
13. Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
14. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
15. Sett SMB, EE2, HP3, og ET2 tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjøring til protokolltrinn

1. Klargjør en isbøtte.
2. Ta reagensrøret ut av esken, og følg instruksjon for tining.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Tabell 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PPC3	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Forsterke anrikt bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Oppbevares på is.	Forsterke anrikt bibliotek

Tabell 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

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

Forsterke anrikt bibliotek

Dette trinnet bruker primere til å amplifisere anrikede biblioteker.

Klargjøring

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

Prosedyre

1. Bland ved å rotere PPC3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Tilsett 5 µl PPC3 i hver bibliotekbrønn på ELU2 PCR-platen.
3. Bland ved å rotere EPM i 5 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
4. Tilsett 20 µl EPM i hver bibliotekbrønn.
5. Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
6. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på en termosyklus, og kjør EL-PCR-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 37](#).

Merk Følg instruksjon for tining i avsnittet Klargjøring til protokolltrinn hvis du fortsetter med [Normalisere biblioteker på side 69](#).

8. Sett PPC3 og EPM tilbake til oppbevaring.

Rense forsterket anrikt bibliotek

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

Klargjøring

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

Figur 4 Klargjør ny 80 % etanol

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

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

Prosedyre

Binde

1. Ta ELU2 PCR-platen ut av termosykleren.
2. Sentrifuger ELU2 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
3. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
4. Tilsett umiddelbart 110 µl SPB i hver bibliotekbrønn på BIND2 MIDI-platen.
5. Overfør 50 µl av hvert bibliotek fra ELU2 PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND2 MIDI-platen.
6. Kast den tomme ELU2 PCR-platen.
7. Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
8. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
9. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
10. Plasser platen på magnetstativet i 5 minutter.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

11. Bruk et P200-dråpetellersett ved 200 µl for å fjerne og kaste *all* supernatant fra hver bibliotekbrønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kast all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.
2. Vask kulene en *andre* gang.
3. Fjern rester av EtOH fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

1. Ta BIND2 MIDI-platen ut av magnetstativet.
2. Snu eller roter for å blande RSB.
3. Tilsett 32 µl RSB i hver bibliotekbrønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
5. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuber i romtemperatur i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-plate PL (Purified Libraries (rensede biblioteker)).
9. Overfør 30 µl av hvert eluat fra BIND2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PL PCR-platen.
10. Kast den tomme BIND2 MIDI-platen.
11. Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen.
12. Sett SPB tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjøring til protokolltrinn

1. Ta reagensrøret ut av esken, og følg instruksjon for tining.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Tabell 30 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

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

Tabell 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

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

2. Følg instruksjon for tining i avsnittet Klargjøring til protokolltrinn hvis du fortsetter på samme dag med [Klargjøre til sekvensering på side 72](#).

Normalisere biblioteker

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

Klargjøring

- Klargjør følgende reagenser:
 - LNB1 – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - LNA1 – Bland ved å rotere.
 - EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - LNW1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyre.
 - LNS1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyren.
- Roter LNB1 i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Vend LNB1-røret for å kontrollere at alle kulene er resuspendert.
- Pipetter LNB1 opp og ned 10 ganger ved hjelp av en P1000 innstilt til 800 µl for å sikre resuspensjon.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

4. Klargjør umiddelbart ny LNA1+LNB1-hovedblanding i et kjegleformet rør.



FORSIKTIG

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

Tabell 32 LNA1+LNB1-hovedblanding

Hovedblandings-komponent	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 tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtere reagenser på side 29](#) for beregninger.

5. Roter LNA1+LNB1-hovedblandingen. Legg til side for trinnet [Binde på side 70](#).
6. Klargjør ny EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 33 EE2+HP3-elueringsblanding for Normaliser biblioteker

Elueringsblandings-komponent	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 tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtere reagenser på side 29](#) for beregninger.

7. Roter ny elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 71](#).
8. Dersom PL PCR-platen kom fra lagring, tin til romtemperatur, sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt og bland ved å pipettere.
9. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BBN (Bead Based Normalization).
10. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Roter LNA1+LNB1-hovedblandingen.
2. Tilsett umiddelbart 45 µl LNA1+LNB1-hovedblanding i hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen.
3. Kast gjenværende LNA1+LNB1-hovedblanding.
4. Tilsett 20 µl av hvert bibliotek fra PL PCR-platen i tilsvarende brønn på BBN MIDI-platen.
5. Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 30 minutter.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

7. Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen, og sett tilbake til oppbevaring.
8. Plasser platen på et magnetstativ i 2 minutter.
9. La stå på et magnetstativ, og bruk en P200-dråpeteller til å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Ta BBN MIDI-platen ut av magnetstativet.
 - b. Tilsett 45 µl LNW1 i hver bibliotekbrønn.
 - c. Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
 - d. Forsegl kanter og brønner fullstendig.
 - e. Rist ved 1800 o/min i 5 minutter.
 - f. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
 - g. Fjern og kast all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
2. Vask kulene en **andre** gang.
3. Fjern rester av supernatant fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.

Eluere

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



FORSIKTIG

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

10. Kast den tomme BBN MIDI-platen.
11. Bland ved å rotere LNS1.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

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

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjøring til protokolltrinn

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

1. Ta biblioteksfortynningsbufferen (HT1) ut fra oppbevaring ved –25 °C til –15 °C, tin til romtemperatur, og legg deretter på is.
2. Følg klargjøringsinstruksjonene i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)* for andre forbruksvarer i settet.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykluser)
3. Ta reagensrøret ut av esken, og følg instruksjon for tining.

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

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PhiX-internkontroll (PhiX)	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur. Oppbevares på is.	Klargjøre til sekvensering

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

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

Klargjøre til sekvensering

Klargjøring

1. Gjennomgå retningslinjene for [Antall biblioteker og valg av indekser på side 31](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

2. Merk et mikrosentrifugerør dHP3 (fortynnet HP3).
3. Merk et mikrosentrifugerør dPhiX (fortynnet PhiX).
4. Forvarm en varmeblokk til 96 °C for mikrosentrifugeprøverør.
5. Klargjør en isbøtte.

Fortynne og denaturere PhiX-kontrollen

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

Poole og denaturere biblioteker for TSO Comprehensive (EU)

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



FORSIKTIG

Sørg for å blande bibliotekbrønnene for optimal ytelse.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

3. Velg ett av følgende alternativer for å poole, denaturere og fortynne bibliotekene.
 - **Alternativ 1:** Sekvenser biblioteker fra RNA-prøver og DNA-prøver samtidig. Se [Alternativ 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen på side 74](#).
 - **Alternativ 2:** Sekvenser bare biblioteker fra DNA-prøver. Se [Alternativ 2: Bare DNA-biblioteker på side 75](#).
 - **Alternativ 3:** Sekvenser bare biblioteker fra RNA-prøver. Se [Alternativ 3: Bare RNA-biblioteker på side 76](#).

Alternativ 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen

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

Klargjøre første fortynning

1. Merk et 1,7 ml mikrosentrifugerør DIL1 (Dilution 1).
2. Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-røret.
3. Tilsett 5 µl PRL i DIL1.
4. Kast PDL- og PRL-rørene.
5. Tilsett 475 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortynning).
6. Bland ved å rotere DIL1-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortynning

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortynning).
5. Bland ved å rotere klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og lagre ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Alternativ 2: Bare DNA-biblioteker

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

Klargjøre første fortynning

1. Merk et 1,7 ml mikrosentrifugerør DIL1 (Dilution 1).
2. Overfør 10 µl PDL til det tomme DIL1-røret.
3. Kast PDL-røret.
4. Tilsett 190 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortynning).
5. Bland ved å rotere DIL1, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive illumina® (EU)

Klargjøre andre fortynning

1. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (fortynning 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortynning).
5. Roter klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt, og oppbevar deretter ved -25°C til -15°C i opptil 30 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Alternativ 3: Bare RNA-biblioteker

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

Klargjøre første fortynning

1. Merk et 1,7 ml mikrosentrifugerør DIL1 (Dilution 1).
2. Overfør 10 µl PRL til det tomme DIL1-røret.
3. Kast PRL-røret.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

4. Tilsett 190 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortynning).
5. Bland ved å rotere DIL1, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortynning

1. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (fortynning 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1646 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:843 fortynning).
5. Roter klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Tilsett 16,7 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og lagre ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Tolking av resultater

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

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

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

Du finner detaljert analyseinformasjon i *Arbeidsflytveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)*.

Resultater for CDx

Det er tre mulige resultater per tiltenkt bruk av CDx:

- **Positive** (Positiv) – En variant er påvist og klassifisert som nivå 1 (CDx).
- **Not detected** (Ikke påvist) – Ingen varianter eller biomarkører knyttet til den tiltenkte bruken av CDx er påvist i prøven. Tumortypen som velges for prøven, er egnet for CDx.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

- **No result** (Intet resultat) – En bestemmelse av variantstatus er ikke mulig av én eller flere av følgende årsaker:
 - Den tiltenkte bruken av CDx gjaldt ikke for den testede prøven fordi tumortypen som ble valgt for prøven, ikke egner seg til tumortypen for CDx.
 - Sekvenseringskjøringen oppnådde ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene.
 - Biblioteket samsvarte ikke med nødvendige kvalitetskontrollspesifikasjoner.
 - Den relevante nukleinsyren ble ikke kjørt.

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

Tumorprofileringsvarianter

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

For tumorprofileringsvarianter klassifiseres positive resultater som genomfunn med dokumentert klinisk signifikans eller genomfunn med potensiell klinisk signifikans i henhold til installert KB og identifisert tumortype. Kvalitetskontroller som ikke består, fører til ingen resultater for varianttypene som er relevante for metrikken for kvalitetskontroller som ikke er bestått. Mer informasjon finnes under [Kvalitetskontrollmetrikk for TSO Comprehensive \(EU\)-rapportresultat på side 79](#) og [Kontrollmetrikk for TSO Comprehensive \(EU\)-rapportresultat på side 82](#). Tumorprofileringsposisjoner med utilstrekkelig dybde angis i rapporten Low Depth (Lav dybde) og ikke i TSO Comprehensive (EU)-rapporten.

Kvalitetskontroll

- Informasjon om nukleinsyrekvantifisering og minimumskrav til inngangsmaterialer finnes under [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23](#).
- Sekvenseringskjøring og prøvegyldighet bestemmes automatisk og rapporteres av TSO Comprehensive (EU) Analysis Module. Programvaren produserer en `MetricsOutput.tsv`-fil (omfatter kjøring, DNA-bibliotekresultater og kvalitetskontrollresultater for RNA-bibliotek) og `ControlOutput.tsv`-fil (omfatter kontrollresultater) som rapporterer om følgende metrikk og spesifikasjoner:

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 36 Kvalitetskontrollmetrikk for TSO Comprehensive (EU)-rapportresultat

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
RNA-biblioteker	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 80,0$	Median fragmentlengde i prøven.	Ingen fusjoner eller spleisevariantresultater rapportert.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeffisient)	$\geq 93,0$	MEDIAN_CV_GENE_500X er en måling av dekningsoverensstemmelsen. For hvert gen med minst 500x dekning beregnes variasjonskoeffisienten i dekning på tvers av genmassen. Denne metrikken er medianen av disse verdiene. En høy verdi indikerer et høyt variasjonsnivå og indikerer et problem i bibliotekklargjøringen, f.eks. lav prøveinnmating og/eller problem med nedtrekking av probe. Denne metrikken beregnes ved hjelp av alle avlesninger (inkludert avlesninger merket som duplikater).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (antall)	$\geq 9\,000\,000$	Det totale antallet avlesninger som kobles til målregionene. Denne metrikken beregnes ved hjelp av alle avlesninger (inkludert avlesninger merket som duplikater).	

*Tilfredsstillende resultater viser PASS (Bestått).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 37 Kontrollmetrikk for TSO Comprehensive (EU)-rapportresultat

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

*Tilfredsstillende resultater viser PASS (Bestått).

- TSO Comprehensive (EU)-rapporten, som er tilgjengelig i PDF- og JSON-format, oppsummerer kvalitetskontrollresultater. Rapportene ligger i analysemappen. Se Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661) for plassering av analysemappen (inneholder PDF- og JSON-rapporter) og kjøringsmappen.
- Gjenta sekvenseringskjøringer som er ugyldige.
- Gjenta bibliotekstestene med følgende resultater:
 - Kontaminerte DNA-biblioteker
 - Ugyldige RNA-biblioteker
 - Testene kan gjentas for å oppnå flere variant- eller biomarkørresultater for DNA-biblioteker som var ugyldiggjort for én, men ikke alle varianttyper.
- Positive kontroller evalueres for variantbestemmelse. Ugyldiggjør sekvenseringskjøringen manuelt hvis de positive kontrollene ikke samsvarer med spesifikasjonene for variantbestemmelse. Analysemodulprogramvaren ugyldiggjør ikke automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater.
- NTC-ene evalueres mot median eksondekning for DNA og gener over median grenseverdi for RNA. Hvis negative kontroller ikke oppfyller spesifikasjonene, ugyldiggjøres bibliotekklargjøringen og alle tilknyttede sekvenseringskjøringer manuelt. Analysemodulprogramvaren ugyldiggjør ikke automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater.
- Utfør ytterligere kvalitetskontrolltiltak i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser eller akkrediteringskrav.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Mer informasjon om å gjenta sekvenseringskjøringer eller tester av biblioteker finnes under [Feilsøking på side 84](#).

Feilsøking

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

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sekvenseringskjøringen samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten	Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. • Sekvenser biblioteker fra Normalized Libraries (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Denaturere og renaturere RNA på side 44 eller Fragmentere gDNA på side 48.
	Instrumentproblem	Kontakt Illuminas tekniske støtte.
Feil med rapportgenerering eller generell sekvenserfeil (f.eks. nettverksfeil, feil med innlasting/utlasting av reagenser, osv.)	Programvare- eller instrumentproblem	Se <i>Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module</i> (dokumentnr. 200008661) for hjelp med rapportgenerering eller se <i>Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet</i> (dokumentnr. 1000000009513). Kontakt Illuminas tekniske støtte for å få mer hjelp.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
DNA-biblioteket samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene	Krav til prøveinngang ble ikke oppfylt	Sørg for egnet prøveinngang, og gjenta bibliotekklargjøring fra Fragmenter gDNA-trinnet. Se Vevskrav på side 23 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23 .
	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten	Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. • Sekvenser biblioteker fra Normalized Libraries (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Fragmentere gDNA på side 48.
	CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE-kriteriene er ikke oppfylt	Informasjon om hvordan krysskontaminasjon unngås, finnes under Advarsler og forholdsregler. Gjennomgå plateoppsett og bibliotekindeksering for å sikre at biblioteker med samme indeks ikke ble sekvensert sammen. Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten for påvirkede biblioteker. Se Fragmentere gDNA på side 48. Det kan ha forekommet kontaminasjon under prøveekstraksjonen. Det kan være nødvendig å gjenta ekstraksjonen for å kontrollere at prøven ikke er kontaminert.
	Brukbar MSI ikke bestått	Gjennomgå ultrasonikatorprodusentens innstillinger for bruk og drift (herunder vannivå og rørtype). Sørg for egnet prøveinngang i analysen. Se Vevskrav på side 23 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23. En ny prøveekstraksjon og/eller gjentakelse av Fragmentere gDNA-trinnet kan være nødvendig hvis prøven er altfor fragmentert eller skadet.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
DNA-biblioteket samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene	Prøven kan være altfor fragmentert eller ha nukleinsyreskade som påvirker muligheten til å generere tilstrekkelige unike biblioteker	Gjennomgå ultrasonikatorprodusentens innstillinger for bruk og drift (herunder vannivå og rørtype). Sørg for egnet prøveinngang i analysen. Se Vevskrav på side 23 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23 . En ny prøveekstraksjon og/eller gjentakelse av Fragmentere gDNA-trinnet kan være nødvendig hvis prøven er altfor fragmentert eller skadet.
RNA-biblioteket samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene	Krav til prøveinngang ble ikke oppfylt	Sørg for egnet prøveinngang, og gjenta bibliotekklargjøringen fra Denaturere og renaturere RNA-trinnet. Se Vevskrav på side 23 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23 .
	Bruks- eller utstyrsfeil i analysearbeidsflyten	Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstyrsfeilen oppsto. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. • Sekvenser biblioteker fra Normalized Libraries (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Denaturere og renaturere RNA på side 44.
	Prøven kan være altfor fragmentert eller ha nukleinsyreskade som påvirker muligheten til å generere tilstrekkelige unike biblioteker	Sørg for egnet prøveinngang. Se Vevskrav på side 23 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 23 . Det kan være nødvendig å ekstrahere prøven på nytt hvis den er altfor fragmentert eller skadet.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Positiv kontroll oppfyller ikke kravene (DNA/RNA)	Kravene til prøveinngang for den positive kontrollen ble ikke oppfylt	Sikre relevant inngang i analysen. Gjennomgå plateoppsettet, og kontroller at de riktige reagensene (prober, indekser) er i de riktige brønnene. Kontroller at den positive kontrollprøven oppbevares i henhold til etiketten. For alle prøver som deler den positive kontrollen: Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. • Sekvenser biblioteker fra Normalized Libraries (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 72. • Anrik biblioteker fra Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-platen på nytt. Se Sette opp første hybridisering på side 57. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Denaturere og renaturere RNA på side 44 eller Fragmentere gDNA på side 48.
	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten	
NTC oppfyller ikke kravene (DNA/RNA)	Det forekom krysskontaminasjon eller kontaminasjon av arbeidsområdet	Gjennomgå informasjonen i avsnittet Advarsler og forholdsregler om dekontaminasjon av arbeidsområder. Informasjon om hvordan krysskontaminasjon unngås, finnes under Advarsler og forholdsregler. Gjennomgå plateoppsett og bibliotekindeksering for å sikre at biblioteker med samme indeks ikke ble sekvensert sammen. Gjenta bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten for alle biblioteker som deler no-template-kontroll (NTC).
	Uriktig indeksering av bibliotek	
Programvare indikerer at positive og/eller negative kontroller ikke var inkludert i sekvenseringskjøringen	Feil tilordning av tumortype i kjøringsplanlegging for Local Run Manager	Sett analyse tilbake i kø med kontroller som er korrekt identifisert som anvist i Arbeidsprosessveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661).

Ytelseskarakteristikker

TSO Comprehensive (EU) er et målrettet NGS-panel med 517 gener. Små DNA-varianter – enkeltnukleotidvarianter (SNV-er), multinukleotidvarianter (MNV-er), insersjoner og delesjoner – kan rapporteres fra alle 517 gener. Genamplifiseringer kan rapporteres fra MET- og ERBB2-genene. Fusjoner kan rapporteres fra de 23 genene som er angitt i [TSO Comprehensive \(EU\)-analysegenpanel på side 2](#). Spleisevarianter kan rapporteres fra MET- og EGFR-genene. For å kunne rapporteres må varianter detekteres og ha evidens i TSO Comprehensive (EU)-analysens KB, og være kvalifisert på grunnlag av den testede vevstypen. NTRK-fusjoner krever at fusjonspartneren må være 5' og at NTRK-kinasedomenet er intakt for å kunne rapporteres.

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

[Tabell 38](#) gir definisjoner av metrikk som er beregnet i ulike studier.

Tabell 38 Metrikkdefinisjoner

Begrep	Definisjon
Positivt prosentsamsvar (PPA)	Prosentandelen av positive som er korrekt identifisert av de totale positive i forhold til en ortogonal metode.
Negativt prosentsamsvar (NPA)	Prosentandelen av negative som er korrekt identifisert av de totale negative i forhold til en ortogonal metode.
Positiv prosent konkordans (PPC)	Prosentandelen av positive betegnelser som er korrekt identifisert av de totale positive i forhold til en kontrolltilstand i en direkte parvis sammenligning.
Negativ prosent konkordans (NPC)	Prosentandelen av negative betegnelser som er korrekt identifisert av de totale negative i forhold til en kontrolltilstand i en direkte parvis sammenligning.
Positiv prosent betegnelse (PPC)	Prosentandel av observasjoner som er positive for et mål blant observasjoner som er forventet å være positive for målet.
Negativ prosent betegnelse (NPC)	Prosentandel av observasjoner som er negative for et mål blant observasjoner som er forventet å være negative for målet.
Samlet prosentsamsvar (OPA)	Prosentandelen av positive og negative som er korrekt identifisert av de totale observasjonene i forhold til en ortogonal metode.

Krysskontaminasjon

Krysskontaminasjonsstudien ble gjennomført for å vurdere om det forekom falske positive resultater grunnet brønn-til-brønn-kontaminasjon under prøvebibliotekklargjøringen og kjøring-til-kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer for TSO Comprehensive (EU)-analysen. To DNA-prøver og to RNA-prøver med unike og ikke-overlappende varianter ble brukt til å evaluere krysskontaminasjon. Trettito DNA-biblioteker og 32 RNA-biblioteker ble klargjort tre ganger av to operatører i et sjakkbrettoppsett med vekslende prøver for å evaluere brønn-til-brønn-kontaminasjon, og med vekslende indekser for å evaluere kjøring-til-kjøring-kontaminasjon ved etterfølgende sekvensering på samme NextSeq 550Dx-instrument. For å evaluere krysskontaminasjon ble små DNA-varianter (som også påvirker TMB) og RNA-varianter evaluert (MSI og genamplifiseringer ble ikke evaluert). Krysskontaminasjonsstudien viste ingen kontaminasjonshendelser, noe som ble observert ved å undersøke de påviste variantene i hver prøve, med ingen påvisning av falskt positive resultater.

Evaluering av ekstraksjonssett for nukleinsyre

Tre kommersielt tilgjengelige DNA- og RNA-ekstraksjonssett ble evaluert med TSO Comprehensive (EU). De tre ekstraksjonssettene isolerte både DNA og RNA fra de samme FFPE-vevssnittene. Settene hadde forskjellige deparafiniseringsmiddel og nukleinsyrebindingstrinn ([Tabell 39](#)). Sett 1 var det dominerende ekstraksjonssettet som ble brukt til å fastslå TSO Comprehensive (EU)-ytelsen.

Tabell 39 Settkarakteristikker

sett	Deparafiniseringsmiddel	Nukleinsyrebinding
1	Proprietær	Kolonne
2	Xylen	Kolonne
3	Mineralolje	Magnetkuler

Syv prøver (fem FFPE-vev og to FFPE-cellelinjer) ble ekstrahert i to eksemplarer av to operatører gjentatt på tre dager for hvert av de tre ekstraksjonssettene (syv prøver x tre ekstraksjonssett x tre ekstraksjonsoperatører x tre ekstraksjonsdager x to ekstraksjonsreplikater).

[Tabell 40](#) oppsummerer virkningene av ekstraksjonssett på bibliotekgyldighet og variantbetegnelse. For bibliotekgyldighet ble den største rateforskjellen mellom ekstraksjonssett rapportert, og signifikansen ble fastslått ved en kvantitativ analyse av bibliotekmetrikken. Hvis ekstraksjonssettgjennomsnittene var signifikant forskjellige for variantbetegnelse, ble forskjellen rapportert.

Det ble observert at ekstraksjonssett påvirket bibliotekets gyldighetsmålinger for små DNA-varianter/TMB og MSI. Metrikk for bibliotekgyldighet for genamplifiseringer og RNA var ikke signifikant forskjellige mellom ekstraksjonssett. Ekstraksjonssett påvirket ikke variantbetegnelse for små DNA-varianter og TMB-score. Ingen falskt positive ble detektert for MSI-score og genamplifiseringer, og en kvantitativ analyse fant ingen signifikante forskjeller i de negative prøvene. Det ble observert at ekstraksjonssett hadde forskjellige støtteavlesningsverdier, slik at det er mulig at fusjoner og spleisevarianter nær LoD-en overses på grunn av valg av ekstraksjonssett.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Det valgte ekstraksjonssettet skal brukes i laboratoriets validering av TSO Comprehensive (EU)-ytelseskarakteristikker og til å gi tilstrekkelig bibliotekgyldighet.

Tabell 40 Ekstraksjonssettpåvirkninger på bibliotekgyldighet og variantbetegnelse

Varianttype	Bibliotekgyldighetsrate (største forskjell)	Variantbetegnelse (største gjennomsnittlige forskjell i underliggende variabel)
Små DNA-varianter	Sett 2 signifikant lavere enn sett 3 (10 %)	Ikke signifikant
TMB		Ikke signifikant
MSI	Sett 1 signifikant lavere enn sett 3 (14 %)	Ingen falskt positive detektert Falskt negative ikke evaluert
Genamplifiseringer	Ikke signifikant (5 %)	Ingen falskt positive detektert Falskt negative ikke evaluert
Fusjoner	Ikke signifikant (3 %)	Sett 1 signifikant lavere enn sett 3 (11 %)
Spleisevarianter		Sett 1 signifikant lavere enn sett 3 (11 %)

Forstyrrende stoffer

Påvirkningen av potensielle endogene og eksogene stoffer på ytelsen til TSO Comprehensive (EU)-analysen ble evaluert på 16 unike FFPE-prøver fra hjerne-, skjoldbruskkjertel-, tykktarms-, bryst-, lunge-, prostata-, hud- og bløtvevstyper. Endogene stoffer, melanin og hemoglobin, ble tilsatt i prøvene under nukleinsyreekstraksjonsprosessen. Eksogene stoffer (etanol, xylen og proteinase K) var til stede under nukleinsyreekstraksjonsprosessen, og de ble også tilsatt i den rensede nukleinsyren før bibliotekklargjøring. Tilsetning av ekstra proteinase K under ekstraksjonsprosessen ble også evaluert, der interferens ble observert med tilsatt proteinase K. Det var en ikke-tilsatt endogen kontroll og buffer eller vanntilsatt eksogen kontroll for hver av de 16 unike prøvene. Effekten av nekrose ble vurdert på et annet sett med åtte FFPE-prøver fra lunge-, hjerne- og tykktarmsvev. Det var en makrodissekert, ingen nekrose-kontroll for hver nekroseprøve. For alle interferenter ble fire replikater per prøve per stoff testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med deres respektive kontroll for deteksjon av små DNA-varianter, genamplifiseringer, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter, samt for MSI-status og TMB-score.

Deteksjon av DNA-variant

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

Deteksjon av RNA-variant

Dataene støtter ingen interferens fra hemoglobin (2 mg/ml), melanin (0,2 µg/ml), etanol (5 %) og xylen (0,0001 %) på RNA-fusjoner eller -spleisevarianter. Tilsvarende var det ingen interferens på deteksjon av RNA-variant da 0,02 mg/ml proteinase K ble tilsatt i RNA før bibliotekklargjøringen, og da opptil 2,6 mg/ml

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

proteinase K ble tilsatt i prøven under RNA-renseprosessen.

Noen falskt positive i forhold til kontrollene uten interferens ble observert mellom replikatbiblioteker for RNA-fusjoner med hemoglobin, melanin, etanol og xylene, og for RNA-spleisevarianter med melanin og xylene. Tilsvarende ble noen falskt negative observert på noen replikatbiblioteker for RNA-spleisevarianter med hemoglobin, melanin, xylene og 0,02 mg/ml proteinase K. De falskt positive og falskt negative ble imidlertid i alle tilfeller ansett for å skyldes prøveproblemer fordi observasjonene for detekterte hendelser viste støtteavlesninger nær LoD. Derfor ble falskt positive og falskt negative på tvers av replikater ansett som ikke relatert til interferens og ble tilskrevet tilfeldig variasjon i antall støtteavlesninger for fusjoner og/eller spleisevarianter ved eller under LoD.

Nekrose

Tilstedeværelse av nekrotisk vev opptil 70 % forstyrrer ikke TMB-score, MSI-status, deteksjon av små DNA-varianter eller RNA-spleisevarianter. Deteksjon av RNA-fusjoner og genamplifiseringer påvirkes i prøver med ≥ 25 % nekroseinnhold i vevsområdet. Hvis prøvedelen inneholder mer enn 25 % nekrose i totalt vevsområde, må det nekrotiske vevet makrodissekteres.

Stabilitet

Sanntidsstabilitet

Sanntidsstabilitet ble brukt til å fastsette TSO Comprehensive (EU)-analysesettets holdbarhet ved oppbevaring i henhold til etiketten. Studieutformingen var basert på testing av 3 loter med reagenser og brukte den klassiske stabilitetsstudieutformingen beskrevet i CLSI EP25-A. Settene ble oppbevart i den endelige konfigurasjonen for settet gjennom hele studiens varighet ved oppbevaringsbetingelser definert på produktetiketten. Fryste settkomponenter ble oppbevart ved -15 °C til -25 °C. Settkomponenter i kjøleskap ble oppbevart ved 2 °C til 8 °C. Komponenter ved romtemperatur ble oppbevart ved 15 °C til 30 °C. Sett ble testet for utseende og funksjonelle settfrigivelseskriterier på angitte tidspunkter. I tillegg ble trender for kvalitetskontrollmetrikk for variantbetegnelse og prøver analysert for kvalitetskontrollmaterialet. Holdbarhet ble fastslått for hvert reagens. Utløpsdatoene tilordnes basert på produksjonsdato og holdbarhet. Settenes utløpsdato angis på grunnlag av reagenset med den tidligste utløpsdatoen.

Settets stabilitet i bruk

TSO Comprehensive (EU)-analysesettets stabilitet i bruk ble evaluert under standard bruksvilkår under holdbarhetstiden for å støtte bruk av flere sett. Reagenssettet ble fryst/tint flere ganger og testet for å kunne bruke settet opptil 4 ganger. 8 RNA- og 8 DNA-biblioteker ble dessuten klargjort i alt 3 ganger for å teste største antall biblioteker som støttes (24 DNA- og 24 RNA-biblioteker per sett). Alle funksjonelle settfrigivelseskriterier ble oppfylt for alle testede fryse-/tinesykluser og tidspunkter.

Testing av FFPE-prøver med reagenser i alderen ≥ 25 måneder ble utført for å vurdere effekten av testing i bruk på variantbetegnelse. En kvalitativ analyse av målrettede varianter viser at hendelsene i bruk ikke påvirket variantbetegnelse.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Bibliotekstabilitet

Stabiliteten til biblioteker klargjort med TSO Comprehensive (EU)-analysen, ble evaluert ved hjelp av åtte FFPE DNA-prøver og åtte FFPE RNA-prøver fra ni forskjellige vevstyper testet trippelt gjennom analysen. Biblioteker fra Normalized Libraries (NL) PCR-platen poolet og sekvensert på dag 0. Det resterende volumet av bibliotekene i NL PCR-platen ble oppbevart fryst (–25 °C til –15 °C), og deretter poolet på nytt og sekvensert på dag 30. Eventuelle statistisk signifikante resultater for små-DNA-varianter mellom dag 0 og dag 30 var teknisk ubetydelige. Det var ingen statistiske forskjeller mellom resultatene på dag 0 og dag 30 for MSI-status, TMB-resultat, genamplifiseringer, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter. Dataene indikerer at biblioteker som genereres fra TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i opptil 30 dager ved –25 °C til –15 °C.

Stabilitet for objektglassmontert FFPE-vev

Stabiliteten til objektglassmonterte FFPE-vev for bruk sammen med TSO Comprehensive (EU)-analysen ble evaluert ved å snitte FFPE-blokker (5 µm snitt) fra 16 unike prøver som representerer ni vevstyper, montering på objektglass, etterfulgt av oppbevaring ved romtemperatur for tre tidspunkter: én dag (kontroll), fire uker og åtte uker. Nukleinsyrer (både DNA og RNA) ble ekstrahert ved det angitte tidspunktet og deretter lagret nedfryst til ekstraksjonene for alle tidspunktene var fullført. Ekstrahert RNA ble oppbevart ved –65 °C til –85 °C, og ekstrahert DNA ble oppbevart ved –15 °C til –25 °C. For hvert tidspunkt ble tre replikater per prøve testet med TSO Comprehensive (EU)-analysen og sammenlignet med kontrollen for små DNA-varianter, MSI-status, TMB-score, genamplifikasjoner, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter. Dataene angir at de objektglassmonterte FFPE-vevene for bruk sammen med TSO Comprehensive (EU)-analysen er stabile i opptil fire uker.

Guardbanding ved innmatingstitrering av nukleinsyre

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

Grense for blank

Prosentandel av falskt positive (av de totalt forventede negative) ble vurdert ved hjelp av replikattesting av normalt eller godartet, tilliggende vev som ikke skulle inneholde somatiske varianter for små DNA-varianter, genamplifiseringer, MSI, RNA-fusjoner og RNA-spleisevarianter. Falskt positive ble ikke analysert for TMB, siden det ikke finnes noen klinisk cutoff. Seks DNA FFPE-prøver og seks RNA FFPE-prøver ble kjørt i to eksemplarer av to operatører på tre dager for hver av de to reagensslotene. Et delsett av prøver ble repoolet og resekvensert i et format med bare 3x DNA og et format med bare 3x RNA for å evaluere falskt positive med flere multiplekse konfigurasjoner støttet av denne enheten. Det var dessuten ytterligere 30 RNA-prøver som ble kjørt dobbelt og behandlet med 1 reagenslot, delt mellom 2 operatører. Det var i alt 168 mulige observasjoner for DNA og 228 observasjoner for RNA redusert på grunn av ugyldige biblioteker for hver varianttype. Prosentandelen av falskt positive ble beregnet ved gennivå for forsterkninger og ved positivt nivå (omtrent 1,9 millioner posisjoner) for små DNA-varianter. Prosentandelen av falskt positive for DNA-varianttyper er vist i [Tabell 41](#). Prosentandelen av falskt positive for RNA-fusjoner og spleisevarianter var 0 % som vist i [Tabell 42](#).

Tabell 41 Falskt positive etter DNA-varianttype

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

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

Tabell 42 Falskt positive etter RNA-varianttype

Varianttype	Falskt positive
Fusjon	0 % (0/226)
Spleisevariant	0 % (0/226)

Deteksjonsgrense

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Studie 1

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

For DNA-varianter ble de to lotene analysert hver for seg ved hjelp av probit-regresjon eller treffratetilnærmingen (laveste testnivå med en treffrate (punktestimat) ≥ 95 %) for å bestemme LoD for hver variant etter lot. Den større LoD på tvers av de to reagenslotene ble tatt som deteksjonsgrense for varianten ([Tabell 43](#)).

For RNA-fusjoner ble FFPE-cellelinjer brukt til å estimere LoD-verdiene for hvert fusjonsgen. LoD-ene ble deretter verifisert med FFPE-vev ved hjelp av to eksemplarer av bibliotekklargjøring mellom tre operatører, tre instrumenter og tre reagensloter for å generere 54 observasjoner per variant i nærheten av LoD fastsatt med FFPE-cellelinjer. De påståtte deteksjonsgrensene for hver fusjon ([Tabell 44](#)) er de laveste gjennomsnittlige støtteavlesningene som nådde en treffrate (punktestimat) ≥ 95 %.

Tabell 43 Deteksjonsgrense for små DNA-varianter av NTRK1, NTRK3 og RET

Markør	Kromosom	Position (Posisjon)	Referanse	Alternativ	Deteksjonsgrense (variantallfrekvens)
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
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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Markør	Kromosom	Position (Posisjon)	Referanse	Alternativ	Deteksjonsgrense (variantallfrekvens)
RET D898_E901del (delesjon)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

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

Tabell 44 Deteksjonsgrense for NTRK- og RET-fusjoner

Gene (Gen)	Fusjon	Deteksjonsgrense (støtteavlesninger)
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

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

DNA-varianter

LoD-ene for 10 klasser av små DNA-varianter (25 varianter totalt) og to DNA-genamplifiseringer (ERBB2 og MET) ble fastslått og oppsummert som områder ([Tabell 45](#)). RET-varianter fra den andre deteksjonsgrensestudien er også inkludert. To av 3 insersjoner større enn 5 bp hadde LoDs på 0,034 og 0,036, mens den tredje hadde en LoD på 0,215. Sistnevnte var en insersjon i et område med lav kompleksitet, der insersjonen legger til flere repetisjoner, påvirker justeringen og krever flere avlesninger for konsekvent deteksjon. Noen genomiske kontekster med lav kompleksitet kan derfor påvirke deteksjon av insersjoner > 5 bp.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 45 Deteksjonsbegrensning for små DNA-varianter og genamplifiseringer

Type (måleenhet for LoD)	Variantklasse / genomisk kontekst	Antall varianter	Område
Små DNA-varianter (variantallfrekvens)	SNV-er	5	0,016–0,064
	MNV-er	3	0,022–0,048
	Insertjon (1–2 bp) nær homopolymerrepetisjoner	2	0,086–0,104
	Insertjon (1–2 bp) nær dinukleotidrepetisjoner	2	0,038–0,051
	Insertjon (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertjon (> 5 bp og opptil 25 bp)	3	0,034–0,215
	Delesjon (1–2 bp) nær homopolymerrepetisjoner	2	0,094–0,100
	Delesjon (1–2 bp) nær dinukleotidrepetisjoner	2	0,033–0,070
	Delesjon (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Delesjon (> 5 og opptil 25 bp)	2	0,047–0,055
Genamplifiseringer (foldendring)	Etter gen (ERBB2, MET)	2	2,034–2,195

Fusjoner

LoD-er ble fastslått for 18 fusjoner, som sto for 20 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet, som varierte fra 10 til 54,7 støtteavlesninger ([Tabell 46](#)). Tre ekstra gener (NTRK 1–3) ble testet i den andre LoD-studien. RET-genet ble testet for her og i den andre LoD-studien. Seksten fusjoner med LoD-er som ble påvist, hadde data som var i overensstemmelse med en vanlig LoD på 16 støtteavlesninger ved bruk av en tosidig, 95 % øvre konfidensgrense (UCL). To fusjoner hadde LoD-er på 24,7 og 44,2 støtteavlesninger som ikke var i overensstemmelse med den vanlige LoD-en.

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

Fusjonen BCL2-IGHJ5 med en LoD-verdi på 44,2 støtteavlesninger har et veldig kort gen (IGHJ5) med bruddpunktet nær starten av et ekson som krever korte innrettinger med luftgap. Følgelig var det nødvendig med flere avlesninger for å oppnå konsekvent deteksjon.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 46 Deteksjonsgrense for fusjoner

Fusjon	Bruddpunkt for gen A	Bruddpunkt for gen B	LoD	Vanlig 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	nei
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	nei
PAX3-FOXO1	41134997	223084859	54,7	ja

Spleisevarianter

De to RNA-spleisevariantene – MET og EGFR – hadde LoD-er på henholdsvis 18,7 og 24,8.

Tumorinnhold

Resultatene i studien informerer om anbefalinger for tumorinnhold for kliniske prøver. Generelt sett er det slik at jo større tumorinnhold, desto høyere er «signalet» (VAF, foldendring eller støtteavlesninger) for varianter i tumoren. Anbefalinger for minimum tumorinnhold er basert på observasjonene som følger. LoD-verdier for små DNA-varianter er ikke større enn 0,104 (med unntak av TP53-insersjonen). For å detektere driver-mutasjoner i tumoren (0,50 variantallfrekvens), anbefales 20 % tumorinnhold, slik at disse mutasjonene vil ha 0,10 VAF og være ved eller over LoD. Ved 20 % tumorinnhold vil gener forsterket til 5,5 foldendring (11 kopier) bli detektert konsekvent basert på en deteksjonsgrense på 1,8 foldendring. Ved 20 % tumorinnhold vil fusjoner med 80 støtteavlesninger bli detektert konsekvent basert på en deteksjonsgrense på 16 støtteavlesninger.

Reproduserbarhet

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

Studie 1

Denne studien ble utført for å vurdere reproduserbarheten til TSO Comprehensive (EU)-analysen på tvers av tre teststeder (ett internt, to eksternt) med to operatører per sted, to replikater innenfor en kjøring og tre ikke-påfølgende testdager. Testing ble utført med et reproduserbarhetspanel inkludert DNA-prøver som inneholdt spesifikke kjente små DNA-varianter for RET og RNA-prøver som inneholdt spesifikke kjente NTRK1-3- og RET-fusjonsvarianter fra formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) vevsprøver og cellerlinjer. Panelet inneholdt DNA- og RNA-panelmedlemmer med lave variantnivåer og høye variantnivåer, med samme antall panelmedlemmer på lavt og høyt nivå for hver variantklasse. Panelmedlemmer på høyt nivå ble målrettet mot ca. 2 til 3 ganger LoD, og panelmedlemmer på lavt nivå ble målrettet mot ca. LoD. På hvert sted testet hver operatør panelmedlemmene i to eksemplarer tre ganger, noe som genererte seks observasjoner per mål per panelmedlem. Fra alle de 3 stedene ble det generert 36 observasjoner per panelmedlem (3 steder/instrumenter × 2 operatører × 2 replikater innenfor kjøring × 3 startdager).

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

Små DNA-varianter for RET

For panelmedlemmer med små DNA-varianter på høyt nivå var samlet PPC 100,0 % (207/207; 95 % CI: 98,2 % til 100,0 %) ([Tabell 47](#)). Samlet PNC for panelmedlemmer med små DNA-varianter på høyt nivå var 100,0 % (1035/1035; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %) ([Tabell 48](#)). For målrettede panelmedlemmer med små DNA-varianter på lavt nivå var samlet PPC for de målrettede panelmedlemmene med små DNA-varianter på lavt nivå 99,1 % (210/212; 95 % CI: 96,6 % til 99,7 %), og samlet PNC var 100,0 % (1026/1026; 95 % CI: 99,6 % til 100,0 %).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 47 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av små DNA-varianter for RET i målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variant-nivå	Variant-type	Målrettet variant (Nukleotid)	Målrettet variant (aminosyre)	n	Gjennomsnittlig VAF	Prosent positive betegnelser (%)	95 % CI*
Høy	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Høy	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Høy	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Høy	Delesjon	chr10_43615611_GAGATGTTTATG A_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Høy	Insersjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	Høy for alle små DNA-varianter	Høy for alle små DNA-varianter	Høy for alle små DNA-varianter	207	Ikke tilgjengelig	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	Delesjon	chr10_43615611_GAGATGTTTATG A_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Lav	Insersjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variant-nivå	Variant-type	Målrettet variant (Nukleotid)	Målrettet variant (aminosyre)	n	Gjennomsnittlig VAF	Prosent positive betegnelser (%)	95 % CI*
Lav	Lav for alle små DNA-varianter	Lav for alle små DNA-varianter	Lav for alle små DNA-varianter	212	Ikke tilgjengelig	99,1 % (210/212)	(96,6 %, 99,7 %)

Forkortelser: I/T, ikke tilgjengelig – VAF, variantallelefrekvens.

* 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 48 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av små DNA-varianter for RET i målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variant-nivå	Varianttype	Målrettet variant (Nukleotid)	Målrettet variant (aminosyre)	n ¹	Prosent negative betegnelser (%)	95 % CI ²
Høy	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 % (173/173)	(97,8 %, 100,0 %)
Høy	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Høy	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Høy	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 % (172/172)	(97,8 %, 100,0 %)
Høy	Delesjon	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Høy	Insertsjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Høy	Høy for alle små DNA-varianter	Høy for alle små DNA-varianter	Høy for alle små DNA-varianter	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 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variant-nivå	Varianttype	Målrettet variant (Nukleotid)	Målrettet variant (amino-syre)	n ¹	Prosent negative betegnelser (%)	95 % CI ²
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	Delesjon	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 % (178/178)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	Insertsjon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Lav	Lav for alle små DNA-varianter	Lav for alle små DNA-varianter	Lav for alle små DNA-varianter	1026	100,0 % (1026/1026)	(99,6 %, 100,0 %)

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

² 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 49 viser varianskomponentanalysen av resultater for variantallelfrekvenser (VAF-er) på tvers av de ca. 36 observasjonene for hvert panelmedlem. Standardavvik (SD) og prosent variasjonskoeffisient (% CV, samlet og for hver kilde) ble beregnet og vist for hver målrettet små DNA-variant for RET.

Tabell 49 Varianskomponentanalyse for TSO Comprehensive (EU)-analyse for VAF i målrettede panelmedlemmer med små DNA-varianter

Vari-ant-nivå	Vari-ant-type	Målrettet variant (Nukleotid)	Mål-rettet variant (amino-syre)	n	Gjen-nom-snitt-lig VAF	Labor-ator-ium SD (% CV)	Oper-atør-SD (% CV)	Dag-SD (% C V)	Repl-ikat-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Høy	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 %)
Høy	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 %)
Høy	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 %)
Høy	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 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Vari- ant- nivå	Vari- ant- type	Målrettet variant (Nukleotid)	Mål- rettet variant (amino- syre)	n	Gjen- nom- snitt- lig VAF	Labor- ator- ium SD (% CV)	Oper- atør- SD (% CV)	Dag- SD (% C V)	Repl- ikat-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Høy	Dele- sjon	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 %)
Høy	Inser- sjon	chr10_43609946_ T_TGTGCCGCAC	RET C634_ T636du p	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	Dele- sjon	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	Inser- sjon	chr10_43609946_ T_TGTGCCGCAC	RET C634_ T636du p	36	0,037	0,005 (13,8 %)	0,000 (0,0 %)	0,003 (9,1 %)	0,006 (15,9 %)	0,008 (22,9 %)

NTRK 1- 3- og RET-fusjoner

For RNA-fusjonspanelmedlemmene på høyt nivå var samlet PPC 99,3 % (285/287; 95 % CI: 97,5 % til 99,8 %) (Tabell 50). PPC var 100 % for hvert panelmedlem på høyt nivå, bortsett fra BCAN-NTRK1-panelmedlemmet (PPC = 94,4 % (34/36; 95 % CI: 81,9 % til 98,5 %)). Samlet PNC for RNA-fusjonspanelmedlemmene på høyt nivå var 100,0 % (1724/1724; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %) (Tabell 51). For målrettede RNA-fusjonspanelmedlemmer på lavt nivå var samlet PPC 95,4 % (272/285; 95 % CI: 92,3 %, 97,3 %), og samlet PNC var 100,0 % (1851/1851; 95 % CI: 99,8 % til 100,0 %).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 50 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av NTRK- og RET-fusjoner i målrettede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variantnivå	Målrettet fusjon	n	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Prosent positive betegnelser (%)	95 % CI*
Høy	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Høy	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Høy	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Høy	Alle fusjoner høy	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 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Variantnivå	Mårettet fusjon	n	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Prosent positive betegnelser (%)	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 fusjoner lav	285	16,8	95,4 % (272/285)	(92,3 %, 97,3 %)

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

Tabell 51 PNC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av NTRK- og RET-fusjoner i ikke-målede panelmedlemmer på høyt og lavt nivå

Variantnivå	Målede fusjoner	n ¹	Prosent negative betegnelser (%)	95 % CI ²
Høy	LMNA-NTRK1	180	100,0 % (180/180)	(97,9 %, 100,0 %)
Høy	BCAN-NTRK1	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Høy	ETV6-NTRK2	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Høy	TRIM24-NTRK2	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Høy	ETV6-NTRK3	144	100,0 % (144/144)	(97,4 %, 100,0 %)
Høy	BTBD1-NTRK3	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Høy	NCOA4-RET	215	100,0 % (215/215)	(98,2 %, 100,0 %)
Høy	CCDC6-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Høy	Alle fusjoner – høy	1724	100,0 % (1724/1724)	(99,8 %, 100,0 %)
Lav	LMNA-NTRK1	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Variantnivå	Målrettede fusjoner	n ¹	Prosent negative betegnelser (%)	95 % CI ²
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 %)
Lav	Alle fusjoner – lav	1851	100,0 % (1851/1851)	(99,8 %, 100,0 %)

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

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

Tabell 52 viser varianskomponentanalysen av støtteavlesninger på tvers av de ca. 36 observasjonene innenfor hver målrettet fusjon. SD og % CV (totalt og for hver kilde) ble beregnet og vist for hver målrettet fusjon.

Tabell 52 Varianskomponentanalyse for TSO Comprehensive (EU)-analyse av støtteavlesninger i målrettede RNA-fusjonspanelmedlemmer

Variant-nivå	Fusjon	n	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	Sted-SD (% CV)	Operator-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Replikat-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Høy	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9 %)	3,37 (9 %)	6,93 (18 %)	9,04 (24 %)	12,39 (33 %)
Høy	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41 %)	7,87 (23 %)	5,40 (16 %)	8,95 (27 %)	18,98 (57 %)
Høy	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33 %)	3,50 (14 %)	4,20 (17 %)	4,86 (20 %)	10,86 (44 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Variant-nivå	Fusjon	n	Gjennom-snittlige støtte-avlesninger	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Replikat-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Høy	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31 %)	4,24 (12 %)	6,82 (19 %)	6,87 (19 %)	15,57 (43 %)
Høy	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20 %)	10,20 (18 %)	9,25 (16 %)	8,69 (15 %)	19,93 (35 %)
Høy	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5 %)	2,65 (8 %)	2,16 (7 %)	10,47 (32 %)	11,11 (34 %)
Høy	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13 %)	4,09 (11 %)	6,17 (17 %)	5,20 (14 %)	10,17 (28 %)
Høy	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 %)
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: Prosent variasjonskoeffisient.
SD: Standardavvik.

Studie 2

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

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

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

Små DNA-varianter

Tabell 53 viser PPC-er for målrettede små DNA-varianter. PPC-er varierte fra 91,3 % for en BRAF SNV til 100 % for de fleste små DNA-varianter.

Tabell 53 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av RNA-varianter i kombinerte målrettede panelmedlemmer for små DNA-varianter

Observert variant-nivå ¹	Variant-type	Målrettet variant (nukleotid)	Målrettet variant (aminosyre)	Gjennomsnittlig VAF ²	Prosent positiv betegnelse (%)	95 % CI ³
$\sim 2\text{--}3\times \text{LOD}$	DELETION (Delesjon)	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 % (28/28)	(87,9 %, 100,0 %)
$\sim 2\text{--}3\times \text{LOD}$	DELETION (Delesjon)	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 % (40/40)	(91,2 %, 100,0 %)
$\sim 2\text{--}3\times \text{LOD}$	INSERTION (Insertjon)	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observert variant-nivå ¹	Variant-type	Målrettet variant (nukleotid)	Målrettet variant (aminosyre)	Gjennomsnittlig VAF ²	Prosent positiv betegnelse (%)	95 % CI ³
~2– 3x LOD	INSERTION (Innersjon)	chr5_112175675_A_ AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	INSERTION (Innersjon)	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 % (4/4)	(51,0 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 % (42/46)	(79,7 %, 96,6 %)
~2– 3x LOD	DELETION (Delesjon)	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	DELETION (Delesjon)	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	INSERTION (Innersjon)	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	INSERTION (Innersjon)	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	DELETION (Delesjon)	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
< 2x LOD	INSERTION (Innersjon)	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 % (2/2)	(34,2 %, 100,0 %)
~2– 3x LOD	INSERTION (Innersjon)	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Variantnivå beregnet fra gjennomsnittlig observert variantallfrekvens.

² Gjennomsnittlig variantallfrekvens beregnet fra observerte analyseresultater.

³ 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

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

Tabell 54 viser varianskomponentanalysen av resultater for VAF-resultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer med målrettede små DNA-varianter.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 54 Varianskomponentanalyse av VAF for målrettede små DNA-varianter

Målrettet variant	N	Gjennom- snittlig VAF	Sted- SD (% CV)	Oper- atør- SD (sted) (% CV)	Dag- SD (sted, oper- atør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjør- ings- SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_ CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_ CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_ 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)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Målrettet variant	N	Gjennomsnittlig VAF	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

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

Genamplifiseringer

Tabell 55 viser PPC-er for målrettede genamplifiseringer. PPC-er var 100,0 % for MET og 100,0 % for ERBB2.

Tabell 55 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av genamplifiseringer i kombinerte målrettede panelmedlemmer

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

¹ Variantnivå beregnet fra gjennomsnittlig observert foldendring.

² Gjennomsnittlig foldendring beregnet fra observerte analyseresultater.

³ 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

PNC-er var 100 % på tvers av genamplifiseringer.

Tabell 56 viser varianskomponentanalysen av foldendringsresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer med målrettede genamplifiseringer.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 56 Varianskomponentanalyse av foldendring for målrettede genamplifiseringer

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

MSI

Tabell 57 viser PPC-er for målrettede MSI-H-panelmedlemmer. PPC-er var 100 % for begge MSI-H-panelmedlemmer.

Tabell 57 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av MSI-H-status i kombinerte målrettede panelmedlemmer

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

¹ Gjennomsnittlig observert MSI-score beregnet fra observerte analyseresultater.

² 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Tabell 58 viser varianskomponentanalysen av MSI-scoreresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer som er målrettet for MSI-H-status.

Tabell 58 Varianskomponentanalyse av MSI-score for målrettede MSI-H-panelmedlemmer

Panel-medlem	N	Gjennom-snittlig MSI-score	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

TMB

For å evaluere reproduserbarheten til TMB-score ble det utført en kvantitativ analyse av scoren i målrettede TMB-panelmedlemmer, som representerte en rekke forventede TMB-score. [Tabell 59](#) viser varianskomponentanalysen av TMB-scoreresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i TMB-panelmedlemmene. Totale SD-er for TMB-score var 1,0 (% CV = 13) for ett panelmedlem (gjennomsnittlig TMB-score = 7,6) og 1,1 (% CV = 2) for et annet panelmedlem (gjennomsnittlig TMB-score = 63,2).

Tabell 59 Varianskomponentanalyse av TMB-score for målrettede TMB-panelmedlemmer

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

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

RNA-varianter

[Tabell 60](#) viser PPC-er for målrettede RNA-varianter. PPC-er varierte fra 91,7 % for KIF5B-RET til 100 % for de fleste RNA-varianter.

Tabell 60 PPC for TSO Comprehensive (EU)-analyse for deteksjon av RNA-varianter i kombinerte målrettede panelmedlemmer

Observert variantnivå ¹	Varianttype	Målrettet variant	Gjennomsnittlige støtteavlesninger ²	Prosent positiv betegnelse (%)	95 % CI ³
~2–3x LOD	Fusjon	ACPP-ETV1	44,7	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	CD74-ROS1;GPC	56,6	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Observert variantnivå ¹	Varianttype	Måltrettet variant	Gjennomsnittlige støtteavlesninger ²	Prosent positiv betegnelse (%)	95 % CI ³
~2–3x LOD	Fusjon	EML4-ALK	49,3	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	FGFR1-GSR	61,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	Fusjon	KIF5B-RET	11,6	91,7 % (44/48)	(80,4 %, 96,7 %)
< 2x LOD	Fusjon	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	Fusjon	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	Fusjon	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Fusjon	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 % (47/48)	(89,1 %, 99,6 %)
~2–3x LOD	Spleisevariant	EGFR vIII	64,0	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2–3x LOD	Spleisevariant	Utelatelse av MET-ekson 14	61,2	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Variantnivå beregnet fra gjennomsnittlige observerte støtteavlesninger.

² Gjennomsnittlige støtteavlesninger beregnet fra observerte analyseresultater.

³ 95 % tosidig konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

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

Tabell 61 viser varianskomponentanalysen av støtteavlesningsresultater for hver variasjonskilde og total variasjon i alle panelmedlemmer med målrettede RNA-varianter.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 61 Varianskomponentanalyse av støtteavlesninger for målrettede RNA-varianter

Målrettet variant	N	Gjennom-snittlige støtte-avlesninger	Sted-SD (% CV)	Operatør-SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Målerett variant	N	Gjennom- snittlige støtte- avlesninger	Sted- SD (% CV)	Operatør- SD (sted) (% CV)	Dag-SD (sted, operatør) (% CV)	Lot-SD (% CV)	Kjørings- SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
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- spleise- variant	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Utelatelse av MET-ekson 14-spleise- variant	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Presisjon innen laboratoriet

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

Studie 1

Presisjon innen laboratoriet ble evaluert for NTRK1-3-fusjoner (lavgradig gliom, glioblastoma multiforme, myofibroblastisk sarkom, sekretorisk brystkreft), RET-fusjoner (skjoldbruskkjertelkreft og hudvev fra en ukjent kreft) og små DNA-varianter av RET (medullær skjoldbruskkjertelkreft) med FFPE-vev fra de angitte krefttypene. Hver prøve ble testet på to variantnivåer: ~1x LoD (lavt variantnivå) og ~2–3x LoD (høyt variantnivå) med unntak av prøven med CCDC6-RET, som kun ble testet på lavt variantnivå. Hver av prøvene på hvert testnivå ble kjørt i to eksemplarer i hver bibliotekklargjøring på tvers av tre (3) operatører. Hver operatør startet bibliotekklargjøring på tre (3) ikke-påfølgende startdager og sekvenserte på tre (3) utpekte NextSeq 550Dx-instrumenter. Tre (3) reagensloter ble testet, noe som genererte 54 observasjoner per nivå. Noen nivåer hadde færre enn 54 observasjoner som følge av ugyldige biblioteker.

Kvalitativ analyse

Den kvalitative konkordansen til variantbetegnelse ble evaluert hver for seg for de to variantnivåene for en gitt variant fra sammenslåtte observasjoner på tvers av alle variabler (operatører, reagensloter, instrumenter, dager og replikater). Prosent positive betegnelser (PPC) og prosent negative betegnelser (PNC) og tilhørende tosidig 95 % konfidensintervall (Wilson-score) er oppsummert i [Tabell 62](#) (små DNA-varianter) og [Tabell 63](#) (RNA-fusjoner).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

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

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

Tabell 62 Kvalitative resultater for målrettede DNA-varianter

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Variantnivå	Variant	Varianttype	Gjennomsnittlig VAF	PPC (95 % CI)	PNC (95 % CI)
Høy (~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 (Delesjon)	0,088	100,0 % (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0 % (192/192) (98,0 – 100,0%)
	RET C618R	SNV	0,146	100,0 % (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0 % (192/192) (98,0 – 100,0%)
	RET M918	SNV	0,078	100,0 % (52/52) (93,1 – 100,0%)	100,0 % (194/194) (98,1 – 100,0%)
	RET D631_ L633delinsE	DELETION (Delesjon)	0,161	100,0 % (32/32) (89,3 – 100,0%)	100,0 % (214/214) (98,2 – 100,0%)

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 63 Kvalitative resultater for målrettede RNA-fusjoner

Variantnivå	Fusjon	Gjennomsnittlige støtteavlesninger	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 %)
Høy	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 tilgjengelig	Ikke testet	100,0 % (324/324) (98,8–100,0 %)

Kvantitativ analyse

Varianskomponentanalyse for begrenset maksimal sannsynlighet (REML) ble utført for å evaluere total variasjon for den underliggende kontinuerlige variabelen (VAF for små DNA-varianter og støtteavlesninger for RNA-

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

fusjoner) og estimere komponentene for presisjon (standardavvik (SD), variasjonskoeffisient (CV)) for hver variasjonskilde (operatører, instrumenter, dager, reagensloter, rester og totalt). Resultatene vises i [Tabell 64](#) for små DNA-varianter og [Tabell 65](#) for RNA-fusjoner.

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

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

VAF-nivå	Variant	Variant-type	N gyl- dige for- søk	Gjennom- snittlig VAF	Oper- atør- SD (% CV)	Instru- ment- SD (% CV)	Lot- SD (% CV)	Dag- SD (% CV)	Rest- SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Lav (~1x LoD)	RET D898_ E901del	DELETION (Delesjon)	54	0,048	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (8,7)	0,014 (30,0)	0,015 (31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (31,3)	0,014 (31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000 (0,0)	0,001 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (25,6)	0,011 (25,7)
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (3,3)	0,000 (0,0)	0,009 (30,7)	0,009 (30,9)
	RET D631_ L633delins E	DELETION (Delesjon)	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
Høy (~3x LoD)	RET D898_ E901del	DELETION (Delesjon)	54	0,088	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (1,4)	0,006 (7,0)	0,017 (19,2)	0,018 (20,5)
	RET C618R	SNV	54	0,146	0,003 (1,7)	0,000 (0,0)	0,020 (13,7)	0,002 (1,1)	0,018 (12,6)	0,027 (18,7)
	RET M918T	SNV	52	0,078	0,002 (3,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (9,1)	0,018 (23,1)	0,020 (25,0)
	RET C634Y	MNV	54	0,095	0,000 (0,0)	0,002 (2,5)	0,002 (2,1)	0,000 (0,0)	0,014 (15,0)	0,015 (15,3)
	RET D631_ L633delins E	DELETION (Delesjon)	52*	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

* Omfatter 20 observasjoner som ikke besto kvalitetskontrollen for median eksondekning, men som har dekning ved RET-variantens posisjon godt over cutoff for lav dybde på 100 (gjennomsnittlig dybde=374).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tabell 65 Kvantitative SD- og CV-resultater for målrettede RNA-fusjoner

Støtte- avlesnings- nivå	Fusjon	N gyl- dige for- søk	Gjennom- snittlige støtte- avlesninger	Oper- atør- SD (% CV)	Instrum- ent-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag- SD (% CV)	Rest- SD (% CV)	Totalt SD (% 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)
Høy	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)

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Studie 2

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

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

Den totale variasjonen i TMB- og MSI-score, sammen med bidraget etter kilde (instrumenter, operatører, loter, dager og rester), ble kvantifisert ved å bruke en varianskomponentmodell på tvers av en rekke scorer.

Standardavviket (SD) og variasjonskoeffisienten (CV) vises i [Tabell 66](#) for TMB og [Tabell 67](#) for MSI etter nivå. Noen nivåer hadde færre enn 54 observasjoner som følge av ugyldige biblioteker.

Tabell 66 SD- og CV-resultater for kvantitativ TMB-score

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 67 SD- og CV-resultater for kvantitativ MSI-score

MSI-status	Nivå	Gjennomsnittlig MSI-score (%)	N gyldige forsøk	Operatør-SD (% CV)	Instrument-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Rest-SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
MS stabil	L1	0,80	53	0,35 (43 %)	0,00 (0 %)	0,15 (18 %)	0,00 (0 %)	0,52 (66 %)	0,64 (81 %)
	L2	5,90	53	0,47 (8 %)	0,00 (0 %)	0,84 (14 %)	0,00 (0 %)	1,26 (21 %)	1,58 (27 %)
MSI-høy	L3	48,68	53	0,19 (0 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	1,19 (2 %)	2,48 (5 %)	2,76 (6 %)
	L4	56,85	54	1,66 (3 %)	0,00 (0 %)	1,92 (3 %)	0,00 (0 %)	3,07 (5 %)	3,98 (7 %)
	L5	72,62	54	0,00 (0 %)	0,47 (1 %)	0,34 (0 %)	0,62 (1 %)	1,28 (2 %)	1,54 (2 %)
	L6	75,29	54	0,00 (0 %)	0,42 (1 %)	0,09 (0 %)	0,00 (0 %)	1,46 (2 %)	1,52 (2 %)
	L7	78,38	54	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,45 (1 %)	0,95 (1 %)	1,06 (1 %)

Variasjonen i TMB-score har en tendens til å øke med gjennomsnittet som forventet fra teoretiske fordelinger av antalldata. Variasjonen i MSI-score for nivåer nær MSI-score = 50 er større enn variasjonen i MSI-score nærmere 0, eller 100 i samsvar med variasjon fra teoretiske fordelinger av andelsdata. Restkomponenten forble den største bidragsyteren til total varians for både MSI- og TMB-score, noe som støtter konklusjonen om at scorene er robuste for operatører, loter, instrumenter og dager.

C5- og C95-verdier rundt cutoff på 20,00 % ble fastslått for MSI ved hjelp av en presisjonsprofil ([Tabell 68](#)).

Tabell 68 C5-C95-intervaller for MSI

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

Ettersom både MSI og TMB er komplekse biomarkører, kan imidlertid analytisk ytelse variere fra prøve til prøve. Det vil si at TMB-variasjon avhenger ikke bare av TMB-verdien, men også av sammensetningen av varianter i prøven, f.eks. varianttype (SNV, indel) og VAF-nivå (nærhet til cutoff for inklusjon). På samme måte avhenger MSI-variasjonen ikke bare av MSI-verdien, men også av sammensetningen av stedene i prøven, f.eks. antall steder som er ustabile, og mengde ustabilitet per sted.

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

MSI-score. MSI høy-prøver forble gjennomsnittlig MSI-H når tumorinnhold var $\geq 30\%$. Endometrieprøver oppførte seg distinkt annerledes enn de andre vevstypene og ble funnet å trenge en større mengde tumorinnhold for å bli betegnet som MSI-H.

Nøyaktighet for tumorprofilering

Deteksjon av varianter ved TSO Comprehensive (EU)-analyse ble sammenlignet med resultatene av referansemeter. Små DNA-varianter og TMB ble sammenlignet med en ekstern neste generasjons sekvenseringsmetode (NGS) for et helt eksom. Genamplifiseringer ble sammenlignet med den samme NGS-metoden for helt eksom eller en validert dobbel in situ-hybridiseringsmetode (DISH) for HER2-forsterkninger. MSI ble evaluert mot en validert MSI-PCR-test. RNA-spleisevarianter ble sammenlignet med en validert kvantitativ PCR-metode (qPCR). ROS1- og ALK-fusjoner ble sammenlignet med validerte FISH-analyser. Alle andre fusjoner ble sammenlignet mot en sammensatt metode bestående av en validert NGS-analyse av helt RNA-eksom (RNGS1), et målrettet NGS-panel (RNGS2) og dråpedigital PCR (ddPCR).

Deteksjon av liten DNA-variant

Deteksjon av små DNA-varianter av TSO Comprehensive (EU)-analysen ble sammenlignet med resultater av sekvensering av hele genomer (WES) som bruker WES med samsvarende prøvepar for tumor/normal for kimbanebetegnelse og somatisk betegnelse av små varianter. Sammenligning av små varianter bestående av enkelt nukleotidvarianter (SNV-er), insersjoner og delesjoner var basert på 124 prøver fra 14 forskjellige vevstyper som var gyldige for både TSO Comprehensive (EU) og WES. TSO Comprehensive (EU), men ikke WES-analysen, kan detektere multinukleotidvarianter (MNV-er, 2–3 bp) som krever fasing. TSO Comprehensive (EU) MNV-er ble evaluert som individuelle SNV-er mot WES. Et sammendrag av konkordans på variantnivået omfattende positivt prosentsamsvar (PPA) og negativt prosentsamsvar (NPA) for alle variantbetegnelser finnes i [Tabell 69](#).

Tabell 69 Konkordanssammendrag for betegnelse av små varianter evaluert etter kimbanestatus eller somatisk status

	WES somatisk betegnet	WES kimbane betegnet	WES ikke betegnet
TSO Comprehensive (EU) betegnet	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) ikke betegnet	69	61	70 000 481
Totalt	451	33 224	70 000 907
Prosentsamsvar	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 %]

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

SNV-er, insersjoner og delesjoner ble også evaluert individuelt for konkordans ([Tabell 70](#), [Tabell 71](#) og [Tabell 72](#)).

Tabell 70 Konkordanssammendrag mellom TSO Comprehensive (EU) og WES for små DNA-varianter (SNV-er)

SNV-er	WES somatisk betegnet	WES kimbane betegnet	WES ikke betegnet	Totalt
TSO Comprehensive (EU) betegnet	320	33 107	369	33 796
TSO Comprehensive (EU) ikke betegnet	58	40	70 000 687	70 000 785
Totalt	378	33 147	70 001 056	70 034 581

Tabell 71 Konkordanssammendrag mellom TSO Comprehensive (EU) og WES for DNA-insersjoner

Insersjoner	WES somatisk betegnet	WES kimbane betegnet	WES ikke betegnet	Totalt
TSO Comprehensive (EU) betegnet	15	23	18	56
TSO Comprehensive (EU) ikke betegnet	5	17	70 034 504	70 034 526
Totalt	20	40	70 034 522	70 034 582

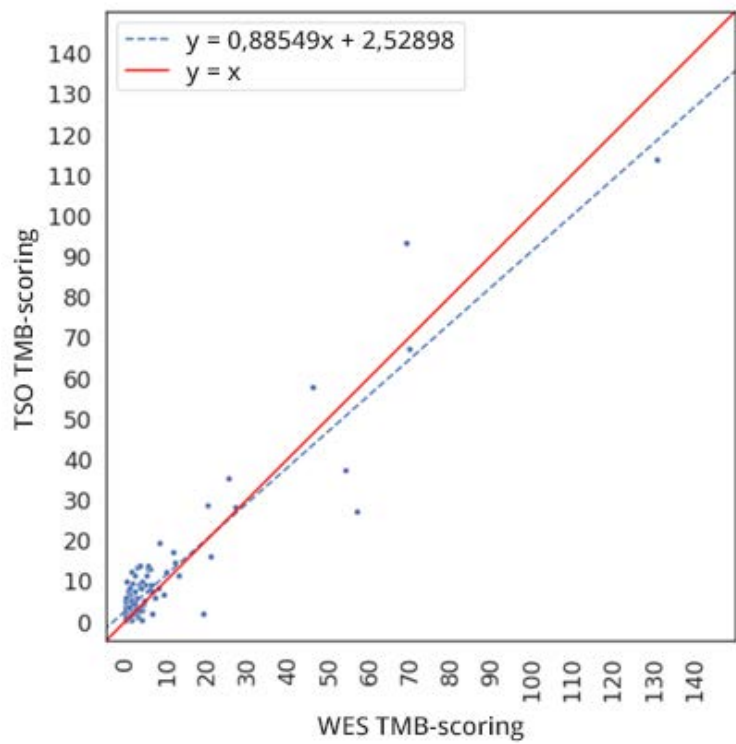
Tabell 72 Konkordanssammendrag mellom TSO Comprehensive (EU) og WES for DNA-delesjoner

Delesjoner	WES somatisk betegnet	WES kimbane betegnet	WES ikke betegnet	Totalt
TSO Comprehensive (EU) betegnet	47	33	39	119
TSO Comprehensive (EU) ikke betegnet	6	4	70 034 453	70 034 463
Totalt	53	37	70 034 492	70 034 582

Deteksjon av tumormutasjonsbyrde

TMB-konkordans ble fastslått ved å sammenligne TMB-score (somatiske mutasjoner / megabase) mellom WES-metoden og TSO Comprehensive (EU) for 124 prøver med tilgjengelige data fra både TSO Comprehensive (EU) og WES. Lineær regresjonsanalyse med WES som prediktor hadde et y-skjæringspunkt på 2,53, en helning på 0,89 og Pearsons korrelasjonskoeffisient på 0,94 ([Figur 5](#)).

Figur 5 TMB-scorekorrelasjon mellom WES og TSO Comprehensive (EU)



Deteksjon av genamplifiseringer

Deteksjon av genamplifiseringer av TSO Comprehensive (EU)-analysen ble sammenlignet med resultatene fra samme WES-analyse ved hjelp av enten samsvarende prøver for tumor/normal eller prøver med bare tumor. Totalt var det 420 prøver hvorav 183 brukte den ortogonale metoden for tumor/normal og 237 brukte metoden for bare tumor. Prøvene var fra 14 vevstyper og inneholdt forsterkninger fra 55 gener. TSO Comprehensive (EU) rapporterer genamplifiseringer fra MET- og ERBB2-genene. Nøyaktighet ble imidlertid vurdert for alle 55 gener. Et sammendrag av genamplifiseringsbetegnelsene finnes i [Tabell 73](#).

Tabell 73 Genamplifiseringsbetegnelser

	WES-positiv	WES-negativ
TSO Comprehensive (EU)-positive	337	415
TSO Comprehensive (EU)-negative	28	24 000

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

	WES-positiv	WES-negativ
Totalt	365	24 415
Prosentsamsvar	PPA: 92 % (337/365) 95 % CI: [89 %, 95 %]	NPA: 98,3 % (24 000/24 415) 95 % CI: [98,1 %, 98,5 %]

ERBB2 (HER2)-forsterkninger i mage- og brystvev ble analysert separat fra andre genamplifiseringer ved å bruke en dobbel in situ-hybridiseringsmetode (DISH). Totalt ble 116 bryst- og mageprøver, hvorav 64 tidligere var karakterisert som HER2-positive ved IHC eller FISH, testet. Én prøve besto ikke i ekstraksjon, 3 prøver besto ikke validitet for TSO Comprehensive (EU), og tre prøver besto ikke validitet for DISH-analyse. Av de 108 prøvene hadde 20 (18,5 %) grensescore på (mellom 1,5 og 2,5) nær DISH-cutoff på 2,0.

Overensstemmelsesresultater inkludert PPA, NPA for alle prøver samt utelatte HER2 DISH-grensetilfeller vises i [Tabell 74](#).

Tabell 74 Sammenndrag av konkordans mellom TSO Comprehensive (EU) og HER2DISH inkludert for HER2-genamplifiseringer

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

Deteksjon av mikrosatellittustabilitet

Deteksjonen av mikrosatellittustabilitet av TSO Comprehensive (EU)-analysen ble sammenlignet med resultatene fra en validert MSI-PCR-rest som bruker samsvarende prøver for tumor/normal til testing. Totalt 195 prøver, som oppfylte kravet til tumorinnhold på ≥ 30 % og representerte 14 vevstyper, ble sammenlignet. MSI-PCR evaluerer fem steder og har tre utfall – MSS (ingen ustabile steder), MSI-lav (ett ustabil sted) og MSI-høy (to eller flere ustabile steder). TSO Comprehensive (EU) evaluerer opptil 130 mikrosatellittsteder og klassifiserer bare prøver som MSS eller MSI-høy (≥ 20 % ustabile steder). MSI-lav ble gruppert med MSS-utfall for MSI-PCR. Konkordansanalyse vises i [Tabell 75](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 75 Sammendrag av konkordansanalyse mellom TSO Comprehensive (EU) og MSI-PCR for DNA-mikrosatellittustabilitet

MSI-ustabilitet	PCR MSI-høy	PCR MSI-lav	PCR MSS
TSO Comprehensive (EU) ustabil (MSI-høy)	40	2	0
TSO Comprehensive (EU) stabil (MSS)	3	0	150
Totalt	43	2	150
Prosentamsvar	PPA: 93 % (40/43) 95 % CI: [81 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % CI: [95 %, > 99 %]	

Deteksjon av RNA-spleisevariant

Nøyaktighet for deteksjon av spleisevariant ble beregnet ved å sammenligne TSO Comprehensive (EU)-resultater med qPCR-analyser for EGFRvIII og Met Exon 14del som inkluderte én kjent positiv RNA for hver av spleisevariantene. Konkordansanalyse ble utført på totalt 230 unike FFPE RNA-prøver fra 14 vevstyper med tilgjengelige data av både TSO Comprehensive (EU)- og referansemetoden. Alle prøver ble henholdsvis testet for MET Exon 14del, mens EGFRvIII kun ble testet i hjernevev. 3 prøver som ble betegnet som positive for MET Exon 14del av qPCR, men ikke av TSO Comprehensive (EU), hadde gjennomsnittlig Ct>37 og var under LoD-nivå for TSO Comprehensive (EU).

Tabell 76 Sammendrag av konkordansanalyse mellom TSO Comprehensive (EU)- og qPCR-analyse for RNA-spleisevarianter

RNA-spleisevarianter	qPCR-positiv	qPCR-negativ
TSO Comprehensive (EU)-positive (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU)-negative (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU)-positive (Met Exon 14Del)	1	0
TSO Comprehensive (EU)-negative (Met Exon 14Del)	3	217
Totalt	7	230
Prosentamsvar	PPA: 57 % (4/7) 95 % CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % CI: [98 %, 100 %]

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Deteksjon av RNA-fusjon

Sammenligning med en sammensatt metode

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

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

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

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

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

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

De sammensatte konkordansresultatmetodene (RNGS1, RNGS2 og ddPCR) for fusjoner vises i [Tabell 77](#).

De 63 fusjonene som var konkordante med den sammensatte metoden, representerte 43 gener i TSO Comprehensive (EU)-panelet. Fusjoner kan imidlertid rapporteres bare fra de 23 genene som er angitt i [TSO Comprehensive \(EU\)-analysegenpanel på side 2](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 77 Krysstabulering av TSO Comprehensive (EU) kontra utfall av sammensatte metoder for RNA-fusjoner (253 prøver)

Fusjoner	Positiv for sammensatt metode	Negativ for sammensatt metode
TSO Comprehensive (EU)-positive	63 ¹	18
TSO Comprehensive (EU)-negative	14 ²	13 821
Totalt	77	13 839
Prosentamsvar	PPA: 82 % (63/77) 95 % CI: [72 %, 89 %]	NPA: 99,9 % (13 821/13 839) 95 % CI: [99,8 %, 99,9 %]

¹ 63 sanne positive TSO Comprehensive (EU) = ni positive som var konkordante med RNGS1 + 13 positive som var konkordante med RNGS2 + 41 positive som var konkordante med ddPCR

² 14 (EU) falskt negative TSO Comprehensive (EU) = fire negative som ikke var konkordante med RNGS1 + én negativ som ikke var konkordant med RNGS2 + ni negative som ikke var konkordante med ddPCR

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

Tjuefem NSCLC-prøver ble testet med FISH for henholdsvis både ROS1- og ALK-fusjoner, og fem ekstra NSCLC-prøver ble testet for ROS1-fusjon. Åtte prøver besto ikke FISH for ROS1 på grunn av utilstrekkelig vev. To ROS1-fusjoner og én ALK-fusjon ble detektert av både TSO Comprehensive (EU) og FISH. Det ble ikke observert diskordante resultater.

ALK+ROS1	FISH-positiv	FISH-negativ
TSO Comprehensive (EU)-positive	3	0
TSO Comprehensive (EU)-negative	0	44
Totalt	3	44
Prosentamsvar	PPA: 100 % (3/3) 95 % CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % CI: [92 %, 100 %]

Prøvegyldighet

Prøvegyldighet (første forsøk) ble målt for 181 unike RNA-prøver og 272 unike DNA-prøver fra FFPE-blokker ≤ 5 år. Disse prøvene ble valgt basert på vevstype og tilgjengelig materiale. Analysegyldighet var ukjent. Kvalitetskontrollmetrikken for bibliotek må bestå for varianttypen for å betraktes som gyldig. Prøvegyldighet ble evaluert separat for hver varianttype (små DNA-varianter/TMB, MSI, genamplifiseringer, fusjoner/spleisevarianter) og vises i [Tabell 78](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 78 Prøvegylldighet

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

Sammendrag av analytisk validering

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

- Små DNA-varianter – SNV-er, MNV-er, insersjoner og delesjoner
- TMB
- MSI
- Genamplifiseringer for MET og ERBB2 (HER2) (se [TSO Comprehensive \(EU\)-analysegenpanel på side 2.](#))
- 23 gener som fusjoner kan detekteres for (se [TSO Comprehensive \(EU\)-analysegenpanel på side 2.](#))
- EGFR- og MET-spleisevarianter (se [TSO Comprehensive \(EU\)-analysegenpanel på side 2.](#))

Klinisk ytelse

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

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

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

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

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

En krysstabulering av resultater for de 499 prøvene vises i tabell 1. Av de 499 prøvene hadde 85 prøver ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater, og av disse 85 hadde 53 også ugyldige resultater for ortogonal metode. I tillegg hadde 7 prøver ugyldige resultater for ortogonal metode. Følgelig hadde 407 av de 499 prøvene gyldige resultater med begge metodene.

Tabell 79 Nøyaktighetsstudie for NTRK: Krysstabulering av resultat for TSO Comprehensive (EU) kontra resultat for ortogonal metode i forbindelse med deteksjon av NTRK-fusjon

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

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

Samsvaranalysene, med og uten ugyldige TSO Comprehensive (EU)-analyseresultater, vises i tabell 2. Uten 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 %).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 80 Nøyaktighetsstudie for NTRK: PPA og NPA for TSO Comprehensive (EU)-analysen sammenlignet med resultat for den ortogonale metoden for deteksjon av NTRK-fusjoner

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

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

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

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

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

NAVIGATE NCT02576431- og SCOUT NCT02637687-studiene leter fortsatt etter kvalifiserte deltakere. På datoen for cutoff av data, 15. juli 2019, var 279 pasienter kvalifisert. Av de 279 pasientene var 208 NTRK-fusjonspositive. Av de 208 positive pasientene dannet 164 larotrectinib ePAS4.

Det primære endepunktet for analysen av larotrectinib-effekt var samlet responsrate (ORR) i henhold til vurdering av en uavhengig granskingskomité (IRC) i et sammenslått datasett fra de 3 kliniske studiene. ORR ble vurdert basert på andelen pasienter med best samlet respons av bekreftet fullstendig respons eller bekreftet delvis respons basert på kriteriene i RECIST, versjon 1.1. ORR i larotrectinib ePAS4 var 72,6 % (95 % CI [65,1 %, 79,2 %]), og omfattet pasienter med 16 forskjellige tumortyper.

Prøveredegjørelse

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

Av de 208 positive studieprøvene av larotrectinib, hadde 154 en prøve tilgjengelig for testing av TSO Comprehensive (EU)-analysen. Av disse hadde 138 gyldige resultater. Femten (15) prøver var ugyldige fordi kvalitetsmetrikk for prøvesekvensering ikke besto, og 1 prøve ble ikke testet på grunn av et protokollavvik. Av de 27 negative studieprøvene av larotrectinib, hadde 24 en prøve tilgjengelig for testing. Av disse hadde 22 gyldige resultater for TSO Comprehensive (EU)-analysen. To prøver var ugyldige fordi kvalitetsmetrikk for prøvesekvensering ikke besto.

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

Konkordansresultater

Samsvar mellom resultater for TSO Comprehensive (EU) i forhold til resultater for LT-metoder, med eller uten gyldige resultater for TSO Comprehensive (EU), vises i [Tabell 81](#).

Tabell 81 Klinisk mellomstudie av NTRK: Konkordans mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metodene for deteksjon av NTRK-fusjoner

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

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

Analyse av sensitivitet mot de manglende resultatene for TSO Comprehensive (EU)-analyse viste robustheten til samsvaranalysen. Manglende resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse for de LT NTRK-fusjonspositive pasientene (n = 70) ble imputert ved bruk av en logisk regresjonsmodell. Samsvarsestimater, inkludert de imputerte verdiene, vises i [Tabell 82](#).

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Tabell 82 Klinisk mellomstudie av NTRK: Konkordans mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metodene for deteksjon av NTRK-fusjoner, inkludert imputerte verdier for LT-positive pasienter med manglende resultater for TSO Comprehensive (EU)-analyse

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

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

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

Samsvar mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-ene etter metodetype (f.eks. RNA NGS, FISH) vises i [Tabell 83](#).

Tabell 83 Klinisk mellomstudie av NTRK: konkordans mellom TSO Comprehensive (EU)-analysen og LT-metodene for deteksjon av NTRK-fusjoner etter LT-metodetype

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

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

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

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

Resultater for klinisk effektivitet

Innen ePAS4 var effektiviteten til larotrectinib hos den TSO Comprehensive (EU)-positive, LT-positive populasjonen (97 pasienter, ORR=78,4 %, 95 % CI [68,8 %, 86,1 %]) lignende effektiviteten til larotrectinib i den samlede ePAS4-populasjonen (164 pasienter, ORR=72,6 %, 95 % CI [65,1 %, 79,2 %]) ([Tabell 84](#)). Av de 97 TSO Comprehensive (EU)-positive pasientene i ePAS4, hadde 28 (28,9 %) pasienter oppnådd en fullstendig respons / kirurgisk fullstendig respons, og 48 (49,5 %) pasienter hadde oppnådd en delvis respons.

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

Tabell 84 Klinisk mellomstudie for NTRK: ORR for LT-positive pasienter med LT og resultater for TSO Comprehensive (EU) i ePAS4

		LT- fusjonspositive N=164	TSO Comprehensive (EU)-positive og LT- positive N=97	TSO Comprehensive (EU)-negative og LT- positive N=13
Beste samlede respons, n (%)	Fullstendig respons	31 (18,9 %)	22 (22,7 %)	1 (7,7 %)
	Kirurgisk fullstendig respons	8 (4,9 %)	6 (6,2 %)	0
	Delvis respons	80 (48,8 %)	48 (49,5 %)	2 (15,4 %)
	Stabil sykdom	25 (15,2 %)	13 (13,4 %)	4 (30,8 %)
	Progressiv sykdom	13 (7,9 %)	6 (6,2 %)	5 (38,5 %)
	Ikke mulig å evaluere	7 (4,3 %)	2 (2,1 %)	1 (7,7 %)
Samlet responsrate	Antall pasienter, n	164	97	13
	Antall pasienter med CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR i % (95 % CI*)	72,6 % (65,1 %, 79,2 %)	78,4 % (68,8 %, 86,1 %)	23,1 % (5,0 %, 53,8 %)

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

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

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

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

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

Referanser

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

Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200007789 v05	September 2022	Oppdaterte reproducerbarhetstabeller for studie 2.
Dokumentnr. 200007789 v04	Juni 2022	La til TSO Comprehensive Analysis Module v2.3.5 PN-er. Fjernet TSO Comprehensive Analysis Module v2.3.3 PN-er. Oppdaterte terminologi i avsnittet Grense for blank.
Dokumentnr. 200007789 v03	April 2022	La til informasjon om ytelseskarakteristikker knyttet til NTRK-fusjoner. La til merkingen KUN FOR EKSPORT. Oppdaterte erklæringen om tiltenkt bruke for å legge til NTRK1-3 CDx-kravet. Utvidet informasjon om produktkomponenter slik at PN-er er med for programvarekomponenter.
Dokumentnr. 200007789 v02	Februar 2022	Rettet opp tabellreferansefeil. Satt inn begrensning knyttet til kimbane og somatiske varianter. Presisert ordlyd rundt påvisning av genamplifiseringer.
Dokumentnr. 200007789 v01	Desember 2021	Oppdaterte prosedyremessige begrensninger. Avklarte spesifikasjonene for magnetstativet og termosyklar i listene over utstyr og materialer.
Dokumentnr. 200007789 v00	November 2021	Første versjon.

Pakningsvedlegg for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

Patenter og varemerker

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

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

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

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

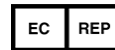
© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformasjon



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



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

Produktmerking

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