

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

(EU) Indlægsseddel

TIL IN VITRO DIAGNOSTISK BRUG. KUN TIL EKSPORT.

Erklæret formål

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) er en kvalitativ *in vitro*-diagnostisk test, som anvender målrettet næstegenerationssekvensering, som muliggør vurdering af homolog rekombinationsmangel (HRD) ved hjælp af DNA ekstraheret fra formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) tumorvævsprøver fra patienter med æggestokkræft ved hjælp af Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrumentet. Testen kan bruges til at detektere enkeltnukleotidvariationer, indsættelser, sletninger og store omlejninger i BRCA1- og BRCA2-gener og rapportere en genomisk ustabilitetsscore (GIS).

Testen er tiltænkt som en ledsagende diagnostisk test for at identificere cancerpatienter, som kan drage fordel af behandling med de målrettede behandlinger, der er anført i [Tabel 1](#), i overensstemmelse med den godkendte mærkning af terapeutiske produkter.

Tabel 1 Indikation af ledsagende diagnosticering

Tumor- type	Biomarkør(er) detekteret	Behandling
Æggestokkræft, herunder epitelial æggestokkræft, kræft i æggelederne og primært peritonealt karcinom	Homolog rekombinationsmangel (HRD) (defineret som skadelige eller formodede skadelige mutationer i BRCA1- og BRCA2- gener og/eller positiv genomisk ustabilitetsscore)	LYNPARZA® (olaparib)

Resumé og forklaring af analysen

Klinisk beskrivelse

Æggestokkræft har den højeste dødelighed blandt de gynækologiske kræftformer. ¹ Æggestokkræft omfatter epitelial æggestokkræft, æggelederkræft og primær peritoneal kræft, som alle har en fælles biologisk oprindelse og betragtes samlet i behandlingsøjemed. ^{2,3} Cirka halvdelen af patienterne med højgradig serøs og endometrioid æggestokkræft, som er relevante histologiske underkategorier, bærer genomiske defekter i den homologe rekombinationsreparationsvej, der resulterer i HRD. ⁴ Tilstedeværelsen af HRD er forbundet med følsomhed over for platinbaseret kemoterapi ⁵ og klinisk respons på poly(adenosindiphosphat [ADP]-ribose) polymerase (PARP)-hæmmere (PARPi), en klasse af målrettede behandlinger mod æggestokkræft, ⁶⁻¹² hvilket resulterer i forbedret progressionsfri overlevelse og samlet overlevelse. ^{5,13,14} I overensstemmelse med resultaterne fra banebrydende kliniske forsøg ^{6,7,12,15} kan egnethed til PARPi-behandling ved æggestokkræft baseres på HRD-positiv status. ¹⁶ PAOLA-1 var et multicenter, fase III, randomiseret, dobbeltblindt,

placebokontrolleret forsøg, der undersøgte den kliniske effekt af olaparib plus bevacizumab som førstelinje-vedligeholdelsesbehandling for patienter med fremskreden æggestokkræft.¹² TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN)-analysen blev valideret ved hjælp af prøver fra patienter, der deltog i det kliniske PAOLA-1-forsøg.

Blandt de forskellige mekanismer, der forstyrrer den homologe rekombinationsreparationsvej, er de bedst beskrevne funktionstabende mutationer i BRCA1- og BRCA2-generne i kimceller og/eller somatiske celler.^{4,13,17} Test, der vurderer genomisk ustabilitet (f.eks. substitutioner, deletioner, ændringer i kopital og strukturelle omlejninger), undersøger for tilstedeværelsen af et genomisk ar eller en mutationssignatur, der indikerer tilstedeværelsen af HRD, uanset den underliggende årsag. GIS er et mål for genomisk ustabilitet, der kombinerer oplysninger om store tilstandsovergange (LST), tab af heterozygoti (LOH) og telomer-allelisk ubalance (TAI). De foreliggende data fra kliniske forsøg underbygger den kliniske validitet af GIS som en biomarkør, der identificerer patienter med æggestokkræft af BRCA-vildtypen, som opnår betydelige fordele ved PARPI-behandling.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er en kvalitativ NGS-baseret ledsagende diagnostisk test (CDx), der angiver HRD-status hos patienter med æggestokkræft ved at påvise små DNA-varianter og deletioner på exonniveau (benævnt store omlejninger [LR]) i BRCA1- og BRCA2-generne, kombineret med en vurdering af GIS i forhold til en grænseværdi på 42.

For en liste over regioner i BRCA1- og BRCA2-generne, som er udelukket fra variationsbestemmelse, henvises der til *TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) blokliste (dokumentnr. 200066147)*, som findes på [Illumina-supportsiden](#).

Procedureprincipper

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

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen involverer følgende processer.

- **Biblioteksklargøring og -berigelse** – Fra FFPE-væv skæres 40 ng genomisk DNA (gDNA) i små fragmenter. Universelle adaptore til sekventering liggeres på gDNA-fragmenterne. P5- og P7-adaptersekvenser inkorporeres i hvert bibliotek for at muliggøre indfangning af biblioteksfragmenter på overfladen af gennemstrømningscellen under sekventering. Adapterne omfatter i5- og i7-indekssekvenser til at identificere hver individuelle prøve og individuelle molekyler ved hjælp af unikke molekyllære identifikatorer (UMI'er). Herefter beriges bibliotekerne for de specifikke gener af interesse baseret på en indfangningsmetode. Biotinylerede probesekvenser, der spænder over genregionerne af interesse, som analysen er målrettet mod, hybridiseres til bibliotekerne. Proberne og de hybridiserede, målrettede biblioteker isoleres fra ikke-målrettede biblioteker ved indfangning med streptavidin magnetiske perler. De målrettede, berigede biblioteker vaskes og amplificeres. Kvantiteten af hvert beriget bibliotek normaliseres herefter ved hjælp af en perlebaseret metode for at sikre en ligelig fordeling af de samlede biblioteker til sekventering.

- **Sekventering og primær analyse** – Normaliserede, berigede biblioteker samles i klynger på en gennemstrømningscelle og sekventeres ved hjælp af sekventering ved syntesekemi (SBS) på NextSeq 550Dx. SBS-kemi anvender en reversibel terminator-metode til at detektere enkelt, fluorescensmærkede deoxynukleotidtriphosphatbaser (dNTP), når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Under hver sekventeringscyklus tilføjes en enkelt dNTP til nukleinsyrekæden. dNTP-mærkatet fungerer som en terminator for polymerisering. Efter hver inkorporering af dNTP bruges det fluorescerende farvestof til at identificere basen og spaltes herefter for at muliggøre inkorporering af det næste nukleotid. Fire reversible, terminator-bundne dNTP'er (A, G, T og C) er til stede som enkelte, separate molekyler. Som følge heraf minimerer naturlig konkurrence inkorporeringsbias. Under den primære analyse foretages basebestemmelser direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekventeringscyklus, hvilket resulterer i base-for-base-sekventering. Der tildeles en kvalitetsscore til hver basebestemmelse.
- **Sekundær analyse** – Analysemodul TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) befinder sig på DRAGEN server, som en del af NextSeq 550Dx-instrument for at formidle TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-kørselskonfigurationen og udføre den sekundære analyse af sekventeringsresultaterne. Analysemodul TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) udfører en analyse, som omfatter validering af kørslen og kvalitetskontrol, efterfulgt af demultiplexing, generering af FASTQ-fil, tilpasning og variationsbestemmelse. Demultiplexing adskiller data fra samlede biblioteker baseret på de unikke sekvensindekser, der blev tilføjet under proceduren til klargøring af bibliotek. Softwaren genererer midlertidige FASTQ-filer, der indeholder sekventeringslæsninger med kvalitetsscorer for hver prøve, undtagen læsninger fra alle clustre, der ikke passeret filteret. Sekventeringslæsningerne tilpasses herefter i forhold til et referencegenom for at identificere en relation mellem sekvenserne og tildeles en score baseret på områder med lighedspunkter. Tilpassede læsninger skrives til filer i BAM-format. Analysesoftwaren bruger separate algoritmer til at bestemme små BRCA1 og BRCA2 DNA-varianter, BRCA1 og BRCA2 store omlejninger og GIs. Analysesoftwaremodul genererer flere output, herunder sekventeringsmålinger og variationsbestemmelsesfiler (VCF). VCF-filer indeholder oplysninger om varianter fundet ved specifikke positioner i et referencegenom. Sekventeringsmålinger og individuelle output-filer genereres for hver prøve.
- **Tertiær analyse** – Tertiær analyse, udført af Analysemodul TSO Comprehensive (EU, DRAGEN), består af CDx-bestemmelse og generering af resultatrapporter. De fortolkede variationsresultater er opsummeret i TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultatrapporten. For detaljer om sekundær og tertiær analyse, se *Vejledning til arbejdsgang for analysemodul (dokumentnr. 200080937) Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)*.

Procedurens begrænsninger

Kun til *in vitro* diagnostisk brug.

- Må kun anvendes på ordination. Testen skal bestilles af kvalificeret sundhedspersonale i overensstemmelse med kliniske laboratoriebestemmelser.

- Beslutninger vedrørende patientpleje og behandling skal være baseret på den behandlende læges uafhængige, medicinske vurdering under hensyntagen til alle gældende oplysninger om patientens forhold og familiehistorik, fysiske undersøgelser, oplysninger fra andre diagnostiske test og patientpræferencer i overensstemmelse med standarden for pleje i et givet samfund.
- Kvaliteten af FFPE-prøven varierer meget. Kvaliteten kan påvirkes på følgende måde.
 - Prøver, der ikke har undergået standardprocedurer for fiksering, genererer muligvis ikke ekstraherede nukleinsyrer, der opfylder kravene til analysens kvalitetskontrol ([Kvalitetskontrol på side 65](#)).
 - Somatiske drivermutationer påvises muligvis ikke pålideligt, hvis tumorindholdet (efter område) er mindre end 20 %.
 - GIS er muligvis ikke pålidelig, hvis tumorindholdet (efter område) er mindre end 33 %.
- Ydeevnen for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) i prøver, der stammer fra patienter, der har fået foretaget organ- eller vævstransplantation, er ikke blevet evalueret.
- Detektion af kontaminering kan påvirkes på følgende måde.
 - I højt omarrangerede genomer med sletning og tab af heterozygositet kan TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-softwaren fejlagtigt klassificere en DNA-prøve som kontamineret (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - Kontaminering under proceduren kan opstå som følge af nukleinsyre fra en tidligere del af prøvebehandlingsprocessen. God laboratoriepraksis og overholdelse af alle forholdsregler og retningslinjer i denne indlægsseddel hjælper med at undgå krydskontaminering mellem prøver.
- Et negativt resultat udelukker ikke tilstedeværelsen af en mutation, der er under analysens detektionsgrænse (LoD). Ændringer ved allelfrekvenser under den etablerede LoD vil muligvis ikke blive detekteret konsekvent.
- Følsomheden af detektering af små DNA-variationer kan være påvirket af:
 - Genomisk kontekst med lav kompleksitet.
 - Stigende variationslængde.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er blevet valideret til påvisning af BRCA-indsætninger og -sletninger med en længde på op til 19 bp og store BRCA-omlejninger på exon-niveau eller derover. Variationer over 19 bp i længden og ændringer og hændelser, der er subeksoniske, vil muligvis ikke blive detekteret af analysen, men kan påvirke HRD-status. Det anbefales at udføre relevante klinisk-patologiske og laboratoriemæssige korrelationer.
- Sletninger på exon-niveau er de eneste store omlejninger rapporteret af TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Indsætning på exon-niveau rapporteres ikke af analysen.

Produktets komponenter

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-testen består af følgende komponenter:

- TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-sæt (Illumina katalognr. 20140799) – Sættet indeholder reagenser med tilstrækkeligt volumen til at generere 24 DNA-biblioteker. Denne volumen inkluderer patientprøver og kontroller. Sættet indeholder det probesæt, der bruges til at detektere BRCA-mutationer. Kontroller sælges separat (se [Nødvendige reagenser, medfølger ikke på side 14](#)).

**FORSIGTIG**

Reagenser til klargøring af RNA-bibliotek leveres med TSO Comprehensive (DRAGEN)-sættet, men er ikke påkrævet til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

- TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)-sæt (Illumina-katalognr. 20134650) – Sættet indeholder reagenser med tilstrækkeligt volumen til at generere 24 DNA-biblioteksberigelser. Denne volumen inkluderer patientprøver og kontroller. Sættet indeholder det probesæt, der bruges til GIS-bestemmelse.
- Analysemoduliet Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (Illumina-katalognr. 20132935), som indeholder følgende komponenter:
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Kravpakker
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Softwarepakke
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) USB-sæt

En servicerepræsentant fra Illumina installerer den relevante version af Analysemoduliet TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) og på Kravpakke på DRAGEN server til NextSeq 550Dx-instrument. For oplysninger om analysemoduliet, henvises til *Vejledning til arbejdsgang for analysemoduliet (dokumentnr. 200080937) Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)*.

Reagenser

Leverede reagenser

Illumina leverer følgende reagenser.

TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) sæt (Illumina katalognr. 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (nedfrosset), delnummer 20031118

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder T4 DNA polymerase og polynukleotidkinase	-25 °C til -15 °C

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder ligase	-25 °C til -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder universelle oligonukleotider til sekventering	-25 °C til -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder universelle oligonukleotider til sekventering	-25 °C til -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder DNA polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C

* Reagens medfølger, men er ikke påkrævet til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (køl), delnummer 20031119

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler	2 °C til 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-opløsning	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, delnummer 20031120

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

**FORSIGTIG**

CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i samme bibliotek.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, delnummer 20031126

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

**FORSIGTIG**

CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i samme bibliotek.

Indeksprimer	Delnummer	Stk.	Volumen	i7-indeks	Sekvens	i5-indeks	Sekvens	Opbevaringstemperatur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCTCTG	-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	ACGTCTCTG	-25 °C til -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCTCTG	-25 °C til -15 °C

Indeksprimer	Delnummer	Stk.	Volumen	i7-indeks	Sekvens	i5-indeks	Sekvens	Opbevaringstemperatur
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCTCTG	-25 °C til -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (køl), delnummer 20031123

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

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset), delnummer 20031121

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder oligonukleotider	-25 °C til -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	-25 °C til -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder rensmiddel	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder P5- og P7-primere	-25 °C til -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte, 2.mercaptoethanol og formamid	-25 °C til -15 °C
PhiX (PX3 eller PhiX)	20031492	1	10 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder PhiX genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, delnummer 20031122

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

* Reagens medfølger, men er ikke påkrævet til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, delnummer 20031127

Følgende reagenser medfølger, men er ikke påkrævede til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

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

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) sæt (Illumina katalognr. 20134650)**TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl), delnummer 20140116**

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder formamid og salte	2 °C til 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte og fast fase-paramagnetiske perler kovalent coatet med streptavidin	2 °C til 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Natriumhydroxidopløsning	2 °C til 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder fast fase paramagnetiske perler	2 °C til 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	1	4,8 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte, 2-Mercaptoethanol og formamid	2 °C til 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Vandig bufferopløsning, der indeholder salte	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Vandig opløsning, der indeholder magnetiske perler	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (nedfrosset), delnummer 20140115

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

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, delnummer 20140117

Reagens	Delnummer	Stk.	Volumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Oligonukleotid-probepool	-25 °C til -15 °C

Nødvendige reagenser, medfølger ikke

Reagenser før amplifikation

- DNA-ekstraktions- og oprensingsreagenser – Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 21](#) vedrørende reagenskrav.
- DNA-kvantificeringsreagenser – Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 21](#) vedrørende reagenskrav.
- TruSight Oncology Controls:
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina katalognr. 20090155)
- Ethanol (EtOH) 100 % (200 proof) til molekylærbiologi
- RNase/DNase-free water

Reagenser efter amplifikation

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

Opbevaring og håndtering af reagens

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

Æske	Delnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (nedfrosset)	20031118	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset)	20031121	Post-amplifikation
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplifikation
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (nedfrosset)	20140115	Post-amplifikation
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Post-amplifikation

Følgende reagensæsker afsendes på gelpakker for at opretholde en temperatur på 0 °C til 10 °C. Opbevares ved 2 °C til 8 °C.

Æske	Delnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (køl)	20031119	Præ-amplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (køl)	20031123	Post-amplifikation
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl)	20140116	Post-amplifikation

**FORSIGTIG**

Opbevar ikke reagenser på et frostfrit opbevaringssted eller i rum i køleskabsdøren.

**FORSIGTIG**

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

- Ændringer i reagensernes udseende kan være tegn på nedbrydning af materialerne. Reagenserne må ikke anvendes, hvis de ændrer udseende (f.eks. farveændring eller uklarhed).
- ERA1-B og TCB1 kan have produktrelaterede partikler. Følg de specifikke retningslinjer for håndtering af hvert reagens.
- Stabiliteten af TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen er blevet evalueret og ydeevne påvist for op til fire anvendelser af sættet. Ved opbevaring ved de indikerede temperaturer er reagenserne stabile indtil den udløbsdato, der er anført på æskens mærkat.

Udstyr og materialer

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, medfølger ikke

Udstyr og materialer præ-amplifikation

Udstyr	Leverandør
Ultrasonikator med tilknyttet ekstraudstyr Se Konfigurationsindstillinger for ultrasonikator til DNA-fragmentering på side 18 .	Almen laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubatorer (2) med indsatser til 96-brønds MIDI-plader (2)	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
Pladecentrifuge med følgende specifikationer: • Kompatibilitet med mikroplader med 96 brønde • Kapacitet til 280 × g (+/- 10 %)	Almen laboratorieleverandør
Pladeryster med følgende specifikationer: • 2 mm orbital radius • Kan omryste ved 1200 og 1800 o/min.	Almen laboratorieleverandør
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk holder med følgende specifikationer: • Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation • Magneter på siden af stativet, (ikke i bunden) • Kompatibilitet med MIDI-plader med 96 brønde	Almen laboratorieleverandør
Præcisionspipetter, der nøjagtigt kan levere volumener fra 2 µl til 1000 µl med følgende specifikationer: • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,02 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,1 µl, 0,2 µl, eller 0,5 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 1 µl eller 2 µl Pipetter skal kalibreres regelmæssigt og have en nøjagtighed inden for 5 % i forhold til den angivne volumen.	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
Is eller kølelegeme	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: • Kan pilles af • Passer til PCR-plader med skørt eller halvskørt • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -20 °C til 100 °C • DNase/RNase-frit	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør med kapacitet på 1,7 ml, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensreservoirs (skål til engangsbrug, 50 ml) (eller tilsvarende)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
Kompatible aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
PCR-plader med 96 brønde, der er kompatible med termocykler, 0,2 ml (brønde af polypropylen)	Almen laboratorieleverandør

Udstyr og materialer efter amplifikation

Udstyr	Leverandør
NextSeq 550Dx instrument	Illumina, katalognr. 20005715
Pladecentrifuge med følgende specifikationer: - Kompatibilitet med mikroplader med 96 brønde - Kapacitet til 280 × g (+/- 10 %)	Almen laboratorieleverandør
Termocykler med følgende specifikationer: - Opvarmet låg (100 °C) - Omfatter et temperaturinterval på 4 °C til 99 °C - Temperaturpræcision: ± 0,25 °C - Kompatibel med PCR-plader med 96 brønde, 0,2 ml - Se Temperaturændringshastighed for termocykler på side 20	Almen laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator med indsats til 96-brønds MIDI-plader	Almen laboratorieleverandør
Tør varmeblok med følgende specifikationer: - Temperaturinterval på 25 °C til 99 °C - Temperaturpræcision: ± 5 °C - Kontrollér, at mikrocentrifugerørene er kompatible med varmeblokken	Almen laboratorieleverandør
Pladeryster med følgende specifikationer: 2 mm orbital radius - Kan omryste ved 1200 og 1800 o/min.	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk holder med følgende specifikationer: - Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation - Magneter på siden af stativet, (ikke i bunden) - Kompatibilitet med MIDI-plader med 96 brønde	Almen laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
Præcisionspipetter, der nøjagtigt kan levere volumener fra 2 µl til 1000 µl med følgende specifikationer: • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,02 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 0,1 µl, 0,2 µl, eller 0,5 µl • Enkelt- eller multikanalpipette med trin på 1 µl eller 2 µl Pipetter skal kalibreres regelmæssigt og have en nøjagtighed inden for 5 % i forhold til den angivne volumen.	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: • Kan pilles af • Passer til PCR-plader med skørt eller halvskørt • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -20 °C til 100 °C • DNase/RNase-frit	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør med kapacitet på 2 ml, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør med kapacitet på 1,7 ml, nukleasefrit	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensreservoirer (skål til engangsbrug, 50 ml) (eller tilsvarende)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
Kompatible aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
PCR-plader med 96 brønde, der er kompatible med termocykler, 0,2 ml (brønde af polypropylen)	Almen laboratorieleverandør
Is eller kølelegeme	Almen laboratorieleverandør

Konfigurationsindstillinger for ultrasonikator til DNA-fragmentering

DNA-fragmentering eller -afklipping har indflydelse på analysens ydeevne ved bestemmelse af fordeling af fragmentstørrelse, der til gengæld påvirker sekventeringsdækningen. Flere konfigurationer målrettet mod ultrasonikering blev evalueret og optimeret for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen ([Tabel 2](#)).

- Afklipningstiden blev justeret for at maksimere målingen MEDIAN_EXON_COVERAGE beskrevet i [Kvalitetskontrol på side 65](#). Afklipningstider (se [Tabel 2](#)) og resultaterne for MEDIAN_INSERT_SIZE afveg på tværs af konfigurationer.
- Konfiguration 1-4 og 6 blev testet med glastrør med 8 strimler. Konfiguration 5 brugte et enkelt glastrør. Rørvolumenkapaciteter er vist i [Tabel 2](#).
- Optimering af konfiguration 3-6 (mindre vandbadsvolumener) brugte pulsering.
- Konfigurationerne 3-5 blev skåret i rør med mindre volumen. Rørvolumenkapaciteter påvirker afklipningsparametrene.
- Konfiguration 4 (linjetransducer, mellemstor vandbadsvolumen, afgasset vand) krævede en lang impulsforsinkelsestid (40 sekunder) for at opnå samme MEDIAN_EXON_COVERAGE som konfiguration 1 og 2 ved nominelt 40 ng input.
- Optimale indstillinger for konfiguration 3 resulterede i en lidt større fordeling af fragmentstørrelsen sammenlignet med de andre konfigurationer (MEDIAN_INSERT_SIZE var ca. 5-10 basepar større).
- Konfiguration 3 og 5 brugte ikke-afgasset vand og den mindste volumen for vandbad.
- Konfiguration 3 og 5 krævede øget DNA-bidrag (50 ng for konfiguration 3, 60 ng for konfiguration 5) for at opnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE i forhold til de andre 4 konfigurationer, som brugte det nominelle 40 ng input.
- Konfiguration 3 og 5 har mere skade og/eller denaturering, og har derfor en reduceret effektiv masse af brugbare dsDNA-molekyler til klargøring af bibliotek.

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

Tabel 2 Evaluerede konfigurationer målrettet mod ultrasonikering

Parameter	Konfiguration					
	1	2	3	4	5	6
Transducer	Linje	Punkt	Punkt	Linje	Punkt	Linje
Volumen for vandbad	5 L	5 L	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Afgasset vand	Ja	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
Vandkøler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Vandbadets temperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Spidseffekt (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% driftscyklus	30	10	30	25	20	25
Cykusser per spring	200	200	1000	1000	1000	600 ⁵
Pulsering (10 sekunders spring)	Nej	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Pulseringsforsinkelsestid	I/T	I/T	10 s	40 s	10 s	10 s
Afklipningstid	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Prøvebehandling	1-8	1	1	1-8	1	1-8
Partistørrelse	1-96	1-96	1-8	1-8	1	1-96
Glaserør med en prøvestørrelse på 8 strimler	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkeltrør (50 µl)	130 µl (eller 96 microTUBE-plade)
Blanding af farver	I/T	I/T	I/T	3 mm Y ved 20 mm/s	I/T	1,5 mm Y ved 10 mm/s
Ækvivalent DNA-bidrag (for median exondækning)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Afklipningstiden på 200 sekunder består af 10 sekunders spring med 20 gentagelser.

² Afklipningstiden på 320 sekunder består af 10 sekunders spring med 32 gentagelser.

Temperaturændringshastighed for termocykler

Optimering af temperaturændringshastigheden for termocykler anbefales. En testet model blev f.eks. justeret fra en standard (og maksimal) ændringshastighed på 5 °C/sek. til 3 °C/sek. for at opnå sammenlignelige resultater med andre modeller med lavere standard ændringshastigheder.

Prøveindsamling, transport og opbevaring

Følg standardprocedurer ved indhentning, transport, opbevaring og behandling af prøver.

Krav til prøver

FFPE-væv

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen kræver 40 ng DNA ekstraheret fra væv fra æggestokke, æggeledere eller primært peritonealt FFPE. Vævet skal fikseres ved hjælp af formalinfiksativ, der er egnet til molekylæranalyser (f.eks. 10 % neutral-bufret formalin). Væv må ikke afkalkes. Inden TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen udføres, skal vævet undersøges af en patolog for at sikre, at det er egnet til denne test. Der kræves et tumorindhold på minimum 20 % (efter område) for at detektere somatiske aktiverende mutationer. Der kræves et tumorindhold på minimum 33 % (efter område) for at detektere GIS.

For at opnå en høj sandsynlighed for at ekstrahere 40 ng DNA, er den anbefalede vævsvolumen $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Denne volumen svarer til et kumulativt levedygtigt vævsområde på $\geq 200 \text{ mm}^2$ med 5 μm tykke sektioner eller $\geq 100 \text{ mm}^2$ med 10 μm tykke sektioner. Det kumulative vævsområde er summen af det levedygtige vævsområde i alle sektioner, der sendes til ekstraktion. Et kumulativt vævsområde på 200 mm^2 kan f.eks. opnås ved at ekstrahere fire 5 μm sektioner med 50 mm^2 vævsområde hver eller fem 10 μm sektioner med 20 mm^2 vævsområde hver. Vævsnekrose kan mindske udbyttet af nukleinsyre. For at minimere muligheden for falsk negative resultater kan vævet makrodissekteres for at fjerne nekrotisk væv og opnå et ønsket levedygtigt tumorindhold.

FFPE-væv på objektglas kan opbevares i op til 28 dage ved stuetemperatur.

Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring

- Ekstrahér DNA fra FFPE-vævsprøver ved hjælp af kommercielt tilgængelige ekstraktionssæt. Forskelle i ekstraktionssæt kan påvirke ydeevnen. Se [Evaluering af sæt til nukleinsyreekstraktion på side 85](#).
- Opbevar ekstraheret stamnukleinsyre i henhold til instruktionerne fra producenten af ekstraktionssættet.
- Opbevar ekstraheret DNA i op til 28 dage ved -25°C til -15°C .
- For at undgå ændringer i koncentrationen over tid skal DNA måles indenfor for 28 dage efter klargøring af bibliotek påbegyndtes. Kvantificér DNA ved hjælp af en metode til fluorometrisk kvantificering, der anvender farvestoffer, som binder nukleinsyre. Nukleinsyrekoncentrationen skal være gennemsnittet af mindst tre målinger.
- Analysen kræver 40 ng af hver gDNA-prøve med en minimum ekstraktionskoncentration på 3,33 ng/ μl . Afklipning kræver en endelig volumen på 52 μl (0,77 ng/ μl) med minimum 40 μl TEB (medfølger) anvendt som fortynder.

Biblioteksopbevaring

Biblioteker kan opbevares på PCR-plader i 7 til 32 dage, afhængigt af bibliotekstypen (se [Tabel 3](#)).

Tabel 3 Bibliotekets holdbarhed

Bibliotekstype	Plade	Antal dage	Opbevaringstemperatur
Fragmenteret gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Inden berigelse	ALS PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Efter berigelse	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
PCR efter berigelse	PL PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Normaliseret	NL PCR	≤ 32	-25 °C til -15 °C

Advarsler og forholdsregler

Sikkerhed



ADVARSEL

Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Ventilation skal være egnet til håndtering af farlige materialer i reagenser. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder beskyttelsesbriller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfare. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- Nogle komponenter i denne analyse indeholder formamid, en alifatisk amid, der er et kræftfremkaldende stof og et sandsynligt reproduktivt toksin. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Bær beskyttelsesudstyr, herunder øjenværn, handsker og kittel. Håndter brugte reagenser som kemikalieaffald, og bortskaf dem i overensstemmelse med de statslige sikkerhedsstandarder for dit område. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) ved at søge efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Leverede reagenser på side 5](#) for yderligere oplysninger).
- Nogle komponenter i denne analyse indeholder 2-mercaptoethanol, et reduktionsmiddel. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation, og bortskaf beholdere og ubrugt indhold i henhold til gældende lokale sikkerhedsstandarder. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) ved at søge efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Leverede reagenser på side 5](#) for yderligere oplysninger).

- Visse komponenter i denne analyse indeholder natriumhydroxid, en stærkt ætsende base. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Bær beskyttelsesudstyr, herunder øjenværn, handsker og kittel. De skal håndteres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og bestemmelser. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) ved at søge efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Leverede reagenser på side 5](#) for yderligere oplysninger).
- Visse komponenter i denne analyse (EPM) indeholder tetramethylammoniumchlorid, et akut giftstof, hudirriterende stof og havforurenende stof. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Bær beskyttelsesudstyr, herunder øjenværn, handsker og kittel. De skal håndteres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og bestemmelser. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) ved at søge efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Leverede reagenser på side 5](#) for yderligere oplysninger).
- Alle prøver skal håndteres, som om de er infektiøse.
- Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel ved håndtering af prøver og analysereagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og analysereagenser.
- Alle alvorlige hændelser, der er relateret til dette produkt, skal omgående indberettes til Illumina og til de kompetente myndigheder i brugerens og patientens opholdsland.

Laboratorie

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

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

Analyse

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

- Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan medføre fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat bibliotekskvalitet.
- Medmindre der er angivet et sikkert stoptidspunkt i [Brugsanvisning på side 33](#), skal du fortsætte til næste trin med det samme.
- Opbevar analysereagenserne og -bestanddelene ved de specificerede temperaturer i de angivne områder til anvendelse før-amplifikation og efter-amplifikation.
- Opbevar ikke reagenser på et frostfrit opbevaringssted eller i rum i køleskabsdøren.
- Reagenser, der indeholder perler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.
- Brug ikke reagenser, der har været opbevaret forkert.
- Afvig ikke fra de procedurer, der er angivet for blanding og håndtering for hver reagens. Utilstrækkelig blanding eller for lang tids blanding på vortexblander kan medføre mislykkede prøveresultater.
- ERA1-B og TCB1 kan have produktrelaterede partikler. Følg retningslinjerne for håndtering af hvert reagens.
- Klargør friske masterblandinger, og kassér den resterende volumen efter brug.
- Klargør altid frisk 80 % ethanol med RNase/DNase-free water til vasketrinnene. Ethanol kan absorbere vand fra luften, hvilket kan påvirke resultaterne. Kassér 80 % ethanol efter brug i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale forordninger.
- Overfør den angivne volumen af eluat. Overførsel af mindre end den angivne volumen af eluat under elueringstrinnene kan påvirke resultaterne.
- Brug følgende retningslinjer for ultrasonikatorer. Sørg for at følge producentens instruktioner.
 - Tilføj gDNA til ultrasonikatorrøret langsomt for at undgå, at der dannes bobler. Overdrevet mange bobler eller en luftlomme i røret til afklipping kan føre til ufuldstændig fragmentering.
 - Dispensér til ultrasonikatorrør langsomt, og undgå at sprøjte.
 - For at undgå væskeforskydning og tab af prøve må pipettespidsen ikke indsættes i bunden af ultrasonikatorrøret ved fjernelse af fragmenteret DNA.
- Pipettér ikke mindre end 2 µl prøveinput.
- Brug ikke en skål til at dispensere reagenser i trin, der kræver tilførsel af mindre end 10 µl materiale til hver prøvebrønd.
- Brug en pipette med fin spids ved overførsel af fragmenterede gDNA-prøver fra ultrasonikatorrørene til biblioteksklargøring (LP)-pladen.
- Brug kun UMI-adaptore.
- Brug ikke SUA1-adaptore.
- Tildel forskellige indeksprimere til hver biblioteksprøve for at identificere hvert bibliotek, når det samles til sekventering på en enkelt gennemstrømningscelle.
- UPxx-indekser eller CPxx-indekser kan anvendes.
- CPxx- og UPxx-indeksprimere må ikke kombineres i det samme bibliotek.

- Uoverensstemmelser mellem prøverne og indeksprimerne medfører rapportering af forkert resultat på grund af mistet identifikation af positiv prøve. Indtast prøve-ID'er, og tildel indekser i Analysemodulet Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN), inden du begynder klargøring af biblioteket. Registrér prøve-ID'er, indeksering og retning for pladebrønd som reference under klargøring af bibliotek.
- Sekventér maksimalt 16 DNA-biblioteker per gennemstrømningscelle. Sekventér mindst seks biblioteker. Følg retningslinjerne i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 30](#).
- Efter bindingstrinnene i [Indfang Targets One på side 47](#) og [Indfang Targets Two på side 51](#) skal du med det samme fortsætte til vasketrinnene for at forhindre, at perlepelleten tørrer.
- Under vasketrinnene skal alt 80 % ethanol fjernes fra bunden af brøndene. Resterende ethanol kan påvirke resultaterne.
- Følg de angivne antal vaske specificeret i [Brugsanvisning på side 33](#) for at opnå optimal analysegydeevne.
- Under proceduren [Normalisering af biblioteker på side 57](#), skal bibliotekets perlepellet resuspenderes omhyggeligt for at opnå ensartet klyngedensitet på gennemstrømningscellen.
- DNA-biblioteker fra den samme prøve beriges med to forskellige probesæt, men bruger det samme indeks og skal sekventeres på den samme gennemstrømningscelle.
- Positive kontroller og ikke-skabelonkontrollen (NTC) skal behandles som en prøve, og opdeles til berigelse med begge probesæt.

Procedurenoter

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbejdsgangen kan udføres i henhold til følgende tidsplan:
 - Dag 1: DNA-fragmentering af gDNA-prøver, biblioteksklargøring, og påbegynd hybridisering natten over (første).
 - Dag 2: Berigelse, normalisering af berigede biblioteker og overførsel af biblioteker på NextSeq 550Dx-instrument.Hvis det ikke er muligt at udføre TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbejdsgangen i henhold til denne tidsplan, er der angivet adskillige sikre stoptidspunkter gennem hele protokollen. Fortsæt straks til næste trin, medmindre der er angivet et sikkert stoptidspunkt i protokollen.
- Biblioteker afledt af DNA opdeles i separate brønde til samtidig berigelse med OPD2-sondesættet og OPD3-sondesættet. Positive kontroller og NTC'er skal følge samme procedure.
- Brug TruSight Oncology Comp Enrichment komponenterne (delnummer 20031123, delnummer 20031121) med OPD2 fra TruSight Oncology Comp Content Set (delnummer 20031122). Biblioteker beriget med OPD2 kaldes DNA-biblioteker.
- Brug TruSight Oncology Comp HRD Enrichment komponenterne (delnummer 20140116, delnummer 20140115) med OPD3 fra TruSight Oncology Comp HRD Content Set (delnummer 20140117). Biblioteker beriget med OPD3 kaldes DNA HRD-biblioteker.

- Tabeller til klargøring af masterblanding omfatter overskud af volumen for at sikre, at der er tilstrækkeligt volumen til det antal prøver, der behandles.
- Brug vand af molekylær kvalitet, der er fri for nukleaser.
- Efter tilføjelse af reagens skal spidsen renses ved at opsuge og dispensere én gang i den relevante brønd i pladen, medmindre andet er angivet i proceduren.
- Stuetemperatur er defineret som 15 °C til 30 °C.
- Reagenser, prøver og biblioteker skal holdes afkølede under visse trin i brugsanvisningen. Dette defineres som opbevaring på is eller tilsvarende.

Termocyklerens programmer

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

Påføring og fjernelse af forsegling på pladen

- Forsegl altid pladerne med en ny, selvklæbende pladeforsegl. Forseglinger må ikke genbruges.
- Pladen forsegles ved på sikker vis at påføre det selvklæbende overtræk med en kile eller rulle til forsegling.
- Forsegl altid 96-brønns pladen med ny, selvklæbende pladeforsegl, inden følgende trin i protokollen udføres.
 - Trin til omrystning af plade
 - Centrifugeringstrin
 - Termocyklertrin
 - Hybridiseringer
 - Langtidsopbevaring
- Sørg for, at kanterne og brøndene er forseglede for at reducere risikoen for krydskontaminering og fordampning.
- Placér pladen på en jævn overflade, inden forseglingen fjernes forsigtigt.
- Centrifuger ved $280 \times g$ i et minut, inden forseglingen fjernes, hvis der observeres væske eller kondensdannelse på forseglingen eller brøndenes sidevægge.
- Brug selvklæbende pladeforseglere, der er effektive ved -20 °C til 100 °C og egnet til PCR-plader med skørt eller halvskørt.

Udstyr

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

Pladetype og overførsler af plade

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

Centrifugering

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

Håndtering af reagenser

- Luk alle reagensrør tæt til umiddelbart efter brug for at begrænse fordampning og forhindre kontaminering.
- Sæt reagenserne tilbage ved de angivne opbevaringstemperaturer, når der ikke længere er behov for dem i en procedure.
- Følg reagensklargøringen, der går forud for hvert procedureafsnit i [Brugsanvisning på side 33](#).
- Sørg for, at klargøre den påkrævede volumen af masterblanding, elueringsblanding og 80 % ethanol til det antal prøver, du behandler.
- Volumener angivet i tabeller over masterblanding og opløsning indeholder overskud. Overskud af volumen beregnes som følger.
 - [Tabel 13](#)
 - Volumen af ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,20)$.
 - Volumen af ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,20)$.
 - [Tabel 23](#)
 - Volumen af EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.

- **Tabel 24**
 - Volumen af EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,364)$.
- **Tabel 30**
 - Volumen af LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (2,0)$.
 - Volumen af LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (2,0)$.
- **Tabel 31**
 - Volumen af EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,25)$.
 - Volumen af HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antal biblioteker}) \times (1,25)$.

Adaptersæt

- Brug kun UMI-adaptore.
- SUA1-adaptore medfølger, men er ikke påkrævede til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

Håndtering af perler

- Tre typer perler er inkluderet i TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen (SPB, SMB og LNB1). Sørg for, at den korrekte perletype anvendes under proceduren.
- Foretag det korrekte antal vaske for hver perletype.
- Sørg for, at perlerne er ved stuetemperatur inden brug.
- Bland perlerne i 1 minut før brug for at sikre homogenitet.
- Brug følgende retningslinjer, når perlerne blandes med en pipette:
 - Brug en pipette og spidsstørrelse, der passer til den volumen, du blander.
 - Justér volumenindstillingen til ca. 50-75 % af prøvevolumenen.
 - Pipetter langsomt uden at slippe pressestempet.
 - Undgå at sprøjte, og dannelsen af bobler.
 - Placer pipettespidsen over pelleten, og dispensér direkte ind i pelleten for at frigive perler fra brønden eller røret.
 - Sørg for, at perlepelleten er helt opløst. Opløsningen bør være mørkebrun og have en homogen konsistens.
 - Vurdér, om der er en perlepellet til stede. Aspirér forsigtigt hele brøndens perleopløsning i spidsen, og se på bunden af brøndene.
- Hvis perlerne suges op i pipettespidsen under trinnene til magnetisk separation, skal du dispensere perlerne tilbage på pladebrønden på det magnetiske stativ. Vent, indtil væsken er klar (ca. 2 minutter), før du fortsætter til næste trin i proceduren.
- Når perlerne vaskes:

- Brug den anbefalede magnetiske holder til pladen.
- Dispensér væske direkte på perlepelleten, således at perlerne på brøndens sider bliver våde.
- Bibehold pladen på det magnetiske stativ, indtil proceduren angiver, den skal fjernes.
- Ryst ikke pladen, mens den er på det magnetiske stativ.
- Forstyr ikke perlepelleten, mens den er på det magnetiske stativ.
- Når perlerne vaskes, eller supernatanten fjernes, skal pipettespidserne vinkles i bunden af brøndene for at undgå, at der dannes et vakuum, og at opløsningen trækkes ind i pipettespidsernes filtre.

Antal biblioteker og valg af indekser

Planlæg antallet af prøvebiblioteker og prøveindekser for sekventeringskørslen inden kørselskonfiguration. De følgende retningslinjer for antal prøver inkluderer positive kontroller, men ekskluderer NTC'er. NTC'er skal føjes til den planlagte kørsel som en ekstra prøve.

Indeksprimere identificerer hver prøve unikt, således at hvert bibliotek kan samles til sekventering på én gennemstrømningscelle. Indekserne vises på skærmen Create Run (Opret kørsel) under kørselskonfiguration i Analysemoduliet Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Tilsæt indeksprimer til hvert prøvebibliotek under biblioteksklargøring. *Brug forskellige indeksprimerblandinger til hvert prøvebibliotek.*

Indekserede biblioteker fra den samme prøve er opdelt i to berigelser med to forskellige probesæt. De resulterende to berigede biblioteker deler det samme indeks, og skal sekventeres på den samme gennemstrømningscelle.

Se [Tabel 4](#) for minimum- og maksimumbiblioteker, som skal sekventeres på én gennemstrømningscelle ved sekventering.

Tabel 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Sekventering

Bibliotekstype	Berigelse	Minimum*	Maksimum*
DNA	OPD2	3	8
DNA HRD	OPD3	3	8

*NTC'er bidrager ikke til pleksiteten.

For optimal udnyttelse af reagens ved sekventering på NextSeq 550Dx-instrument, skal der sekventeres 8 DNA (OPD2) biblioteker og 8 DNA HRD (OPD3) per gennemstrømningscelle.

Sørg for, at de indeksprimere, du bruger med prøverne, matcher de indekser, du valgte til analyse med Analysemoduliet Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN).

Uoverensstemmelser medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve.

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen indeholder to typer indekser (UPxx og CPxx).

Ved sekventering af minimumsantallet af biblioteker (3 DNA-biblioteker og 3 DNA HRD-biblioteker) gælder følgende krav:

- Brug ikke CPxx-indekssæt.

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

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

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kræver TruSight Oncology DNA Control v2 som positiv kontrol. Inkluder TruSight Oncology DNA Control v2 for hver DNA-sekventeringskørsel i en given biblioteksklargøring. Der klargøres en unik, positiv kontrol for hver planlagt sekvenskørsel. Der henvises til Indlægsseddel til TruSight Oncology DNA Control v2 (EU) for yderligere oplysninger.

TruSight Oncology DNA Control v2 Inputmængden er 2 µl.

Inkluder den relevante NTC i hver biblioteksklargøring. NTC'en sekventeres gentagne gange i ét klargjort bibliotek. Følg disse retningslinjer for den positive kontrol og NTC:

- Klargør biblioteker fra positive kontroller og NTC'er, på samme måde som prøverne. Den positive kontrol og NTC skal opdeles til berigelse med begge probesæt identisk med prøverne.
- Brug TEB til DNA NTC.
- De positive kontroller er inkluderet i maksimumskravet til biblioteket.
- NTC'erne er ikke inkluderet i minimumskravet til biblioteket.
- Brug NTC'ens UP-indekser ved sekventering af det minimale antal biblioteker.
- Da NTC'en sekventeres gentagne gange, kan de valgte indekser for denne kontrol ikke gentages ved biblioteksklargøring.

Følgende tabeller viser eksempler på pladeindretninger til arbejdsgangen biblioteksklargøring ([Figur 1](#)). Hver nummereret kolonne repræsenterer en enkelt sekventeringskørsel. NTC'en sekventeres for hver kolonne eller hvert sæt af kolonner.

Tabel 5 Plade til biblioteksklargøring i en enkelt kørsel, inklusive seks patientprøver

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

Tabel 6 Plade til biblioteksklargøring af tre kørsler, inklusive 20 patientprøver

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

Brugsanvisning

En oversigt over TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbejdsgangen vises i [Figur 1](#) og [Figur 2](#).

Arbejdsgang til klargøring af bibliotek

[Figur 1](#) illustrerer arbejdsgangen til biblioteksklaring for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Positive kontroller og NTC'er skal behandles på samme måde som prøver. Sikre stoptidspunkter er markeret mellem trinnene.

Før protokollen startes, skal kørsels- og prøveoplysninger indtastes i Analysemodulet Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Se *Vejledning til arbejdsgang for analysemodulet* (dokumentnr. 200080937) *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)*.

Figur 1 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Arbejdsproces (del 1)

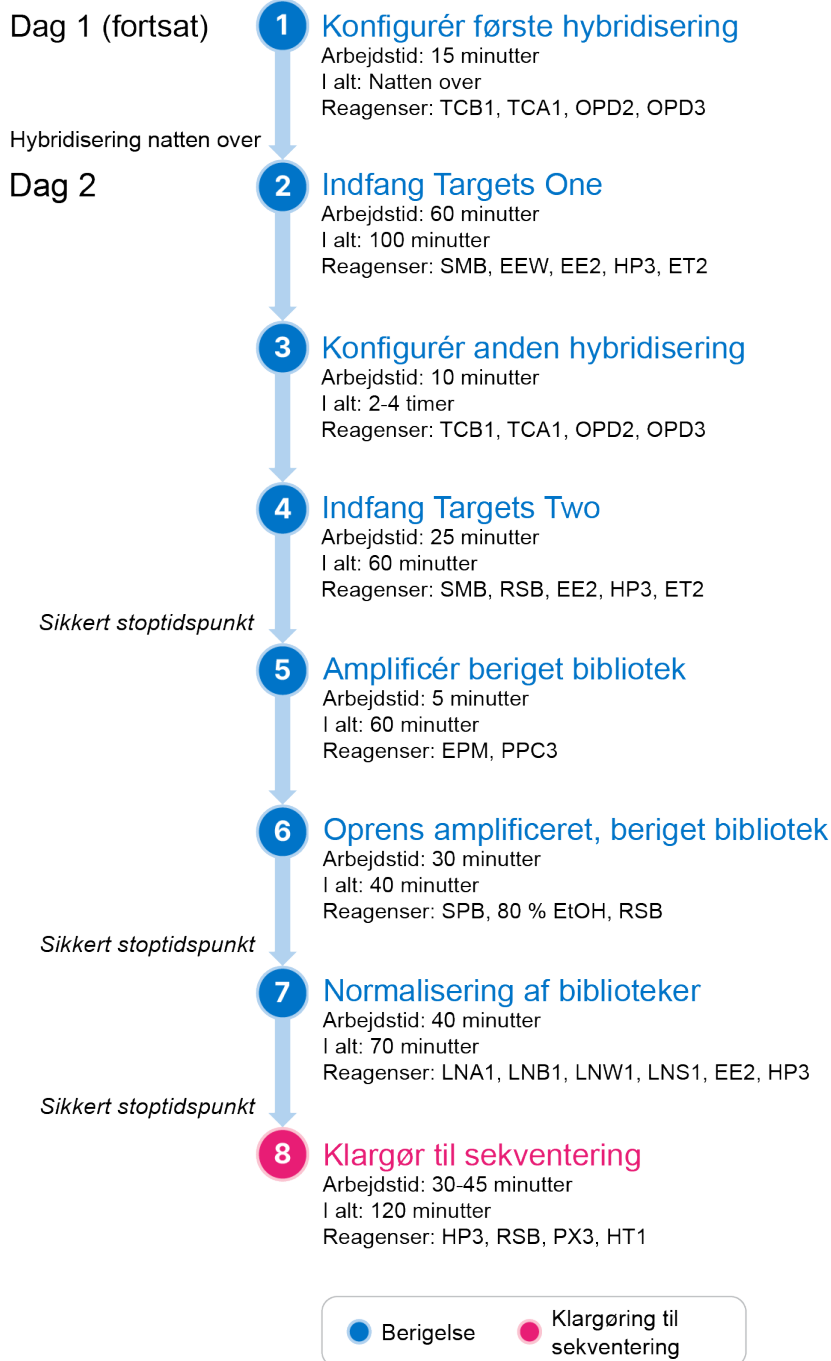


* Arbejdstider og tider i alt er omtrentlige.

Arbejdsgang for berigelse

Figur 2 illustrerer arbejdsgangen for berigelse. Sikre stoptidspunkter er markeret mellem trinnene.

Figur 2 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Arbejdsgang (del 2)



Programmér termocykler

Inden analysen startes, skal følgende programmer gemmes på termocykler efter amplifikation.

Tabel 7 Programmer på termocykler efter amplifikation

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Indeksér PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 cyklusser med: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • Hold ved 10 °C
Foretag første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • Opretholdes ved 57 °C i 8 til 24 timer
Foretag anden hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • Opretholdes ved 57 °C i 1,5 til 4 timer
Amplificér beriget bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 18 cyklusser med: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • Hold ved 10 °C

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.



FORSIGTIG

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

1. Dekontaminér arbejdsområderne grundigt med et RNase/DNase-inhiberende rensemiddel.
2. Følg producentens instruktioner for at konfigurere ultrasonikatorens.
3. Hent DNA-kontrollerne fra opbevaringen.
4. Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (køl) (delnummer 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TEB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Fragmentér gDNA

Fragmentér gDNA

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

Klargøring

1. Følg anbefalingerne i [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 21](#) for at kvantificere prøver.
2. Klargør TEB – Vend op og ned, eller bland på vortexblander.

Fremgangsmåde

Klargør pladen

1. Markér en ny 96-brønnds MIDI-plade LP (Biblioteksklargøring).
Hvis du stopper ved [SIKKERT STOPTIDSPUNKT på side 37](#), skal du bruge en PCR-plade.
2. Dæk og sæt til side til brug i [Overfør fragmenteret DNA på side 37](#).

Fortynd gDNA

1. Optø gDNA-prøver og DNA-kontroller ved stuetemperatur.
2. Bland hver gDNA-prøve 10 gange ved pipettering.
3. Centrifuger røret kortvarigt for at opsamle små dråber.
4. Vend TEB op og ned, eller bland på vortexblander.
5. Brug TEB til at klargøre hver gDNA-prøve i en endelig volumen på 52 µl. Se følgende tabel for inputmængder og minimumskoncentrationer baseret på prøvetype.

- Analysen kræver en minimum ekstraktionskoncentration for at tillade mindst 40 µl TEB af volumen på 52 µl.
- Til DNA- kontrol anvendes 2 µl i en endelig volumen på 52 µl.
- For at forhindre prøvetab må der ikke tilføjes mindre end 2 µl prøve ved pipettering til denne fortynding.

Prøvetype	Inputmængde (ng)	Minimumskoncentration (ng/µl)
FFPE	40	3.33
Kontrol	40	20

Fragment

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



FORSIGTIG

Tilføj gDNA'et til røret langsomt, og sørg for, at der ikke er nogen luftlommer i bunden af røret. Se [Analyse på side 24](#) og producentens instruktioner for at få mere at vide.

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

Overfør fragmenteret DNA

1. Sørg for, at pladeindretning og indekser for hver prøve svarer til den kørsel, du vælger til analyse med Analysemodul TSO Comprehensive (EU, DRAGEN).
2. Følg instruktionerne fra producenten af ultrasonikatoren for at gendanne prøven.
For visse typer ultrasoniske rør er centrifugering påkrævet for at samle prøven i røret.
3. For hver fragmenteret gDNA-prøve skal du bruge en pipette med fine spidser til at foretage tre overførsler på 16,7 µl til en tom brønd i LP-pladen.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP-pladen.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

Sørg for, at termocyklerens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 35](#).

1. Klargør en isspand eller tilsvarende.

2. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (nedfrosset) æske (delnummer 20031118)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
ERA1-A	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Udfør End repair og A-tailing
ERA1-B	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Udfør End repair og A-tailing
ALB1	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
LIG3	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Ligering af adaptore
UMI (hvidt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
STL	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Ligering af adaptore
EPM	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Indeksér PCR

Tabel 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (køl) æske (delnummer 20031119)

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

Tabel 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers æske (delnummer 20031120)

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

Tabel 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers æske (delnummer 20031126)

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

Udfør end repair og A-tailing

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

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

Klargøring

- Forvarm to mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokindsatser som følger.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
- Klargør følgende reagenser.
 - ERA1-A – Centrifuger kortvarigt, og bland derefter ved pipettering. Hold afkølet.
 - ERA1-B – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
Inspicér for bundfald. Hvis der er bundfald, skal du opvarme røret til 37 °C og derefter blande ved pipettering, indtil bundfaldet opløses.
- Klargør ERA1-masterblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 13 ERA1 Master Mix*

Bestanddel i masterblandingen	4 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 28](#) for beregninger.

- Pipetter langsomt 10 gange for at sikre homogenitet, og centrifuger derefter kortvarigt. Hold ERA1-masterblanding afkølet.
- Vælg én af de følgende tre muligheder for at klargøre pladen:
 - Hvis prøverne er i en MIDI-plade, klargøres som følger.
 - Markér MIDI-pladen LP2 (Biblioteksklargøring 2).
 - Hvis nogle prøver er i separate MIDI-plader, skal alle prøver overføres til separate brønde i samme MIDI-plade i henhold til pladelayoutet.
 - Hvis pladen er frosset, klargøres på følgende måde.
 - Optø LP PCR-pladen til stuetemperatur.
 - Centrifuger pladen ved 280 × g i 1 minut.
 - Bland 10 gange ved pipettering.
 - Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP2 (Biblioteksklargøring 2).
 - Overfør alle 50 µl af hver prøve fra LP PCR-pladen til den tilsvarende brønd i LP2 MIDI-pladen.
 - Kassér LP PCR-pladen.

Fremgangsmåde

- Tilføj 10 µl ERA1-masterblanding til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
- Kassér den resterende ERA1-masterblanding.
- Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

4. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
5. Inkubér i en forvarmet mikroprøveinkubator ved 30 °C i 30 minutter.
6. Overfør straks til en anden, forvarmet mikroinkubator.
7. Inkuber ved 72 °C i 20 minutter.
8. Hold LP2 MIDI-pladen afkølet i 5 minutter.

Ligering af adaptore

Denne proces ligerer adaptore til enderne af gDNA-fragmenterne.

Klargøring



FORSIGTIG

Brug kun UMI-adaptore. SUA1-adaptore medfølger, men de er ikke påkrævede til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

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

Fremgangsmåde

1. Fjern LP2 MIDI-pladen fra is eller tilsvarende.
2. Tilføj 60 µl ALB1 til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen ALB1 er en tyktflydende opløsning. Pipetter langsomt for at minimere bobledannelse.
3. Tilføj 5 µl LIG3 til hver prøvebrønd.
4. Tilføj 10 µl UMI (hvidt låg) til hver prøvebrønd.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Inkubér ved stuetemperatur i 30 minutter.
8. Bland på STL vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
9. Tilføj 5 µl STL til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
10. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

11. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.

Orensning ved ligering

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

Klargøring

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

Tabel 14 Klargør frisk 80 % ethanol

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

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

Fremgangsmåde

Bind

1. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
2. Tilføj straks 112 µl SPB til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale per prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, efter at SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
3. Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
4. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
5. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
6. Placer LP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder i 10 minutter.
7. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

Vask

1. Vask perlerne, som følger.
 - a. Hold LP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.
3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EtOH fra hver brønd.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluér

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

Indeksér PCR

I dette trin amplificeres biblioteksfragmenter ved hjælp af primere, der tilføjer indekssekvenser til multipleksering af prøve. Det resulterende produkt indeholder det komplette bibliotek af DNA-fragmenter flankeret af adaptore, der kræves til klyngegenerering.

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - EPM – Hold afkølet.
 - UPxx – Bland på vortexblander, og centrifugér kortvarigt.
 - CPxx – Bland på vortexblander, og centrifugér kortvarigt.

2. Sørg for, at indekser for hver prøve matcher den kørsel, der blev planlagt i Analysemodulet TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) under kørselskonfigurationen. Sørg for at følge instruktionerne vedrørende valg af indeks i [Antal biblioteker og valg af indekser på side 30](#).

**FORSIGTIG**

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

Fremgangsmåde

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

**FORSIGTIG**

Håndtér og åbn kun ét indeksprimerrør ad gangen. Luk hvert indekstrør med et nyt låg umiddelbart efter brug. Kombinér ikke indeksprimere.

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

**FORSIGTIG**

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

7. Centrifuger LS PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
8. Placer på den forprogrammerede termocykler til anvendelse efter amplifikation, og kørsel I-PCR-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 35](#).
Hvis du fortsætter med [Konfigurer første hybridisering på side 44](#), skal du følge instruktionerne til optøning af reagenser i trinnene Klargør protokol.
9. Når I-PCR-programmet er færdigt, skal LS PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut.
10. Markér pladen ALS (Amplificerede biblioteksprøver).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til hybridisering natten over.

1. Sørg for, at termocyklerens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se [Programmér termocykler på side 35](#).
2. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl) æske (delnummer 20140116)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Konfigurer første hybridisering

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20031121) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20140115)

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

Tabel 17 TruSight Oncology Comp Content Set, æske (delnummer 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPD2 (hvidt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer første hybridisering

Tabel 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set, æske (delnummer 20140117)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPD3 (blåt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer første hybridisering

Konfigurer første hybridisering

Under denne proces hybridiseres to oligopuljer (OPD2 og OPD3) til gDNA-biblioteker klargjort i [Indeksér PCR på side 42](#). Berigelse af målrettede regioner kræver to hybridiseringstrin. I den første hybridisering hybridiserer oligoer til cDNA- og/eller gDNA-biblioteker natten over (8 til 24 timer).

Klargøring

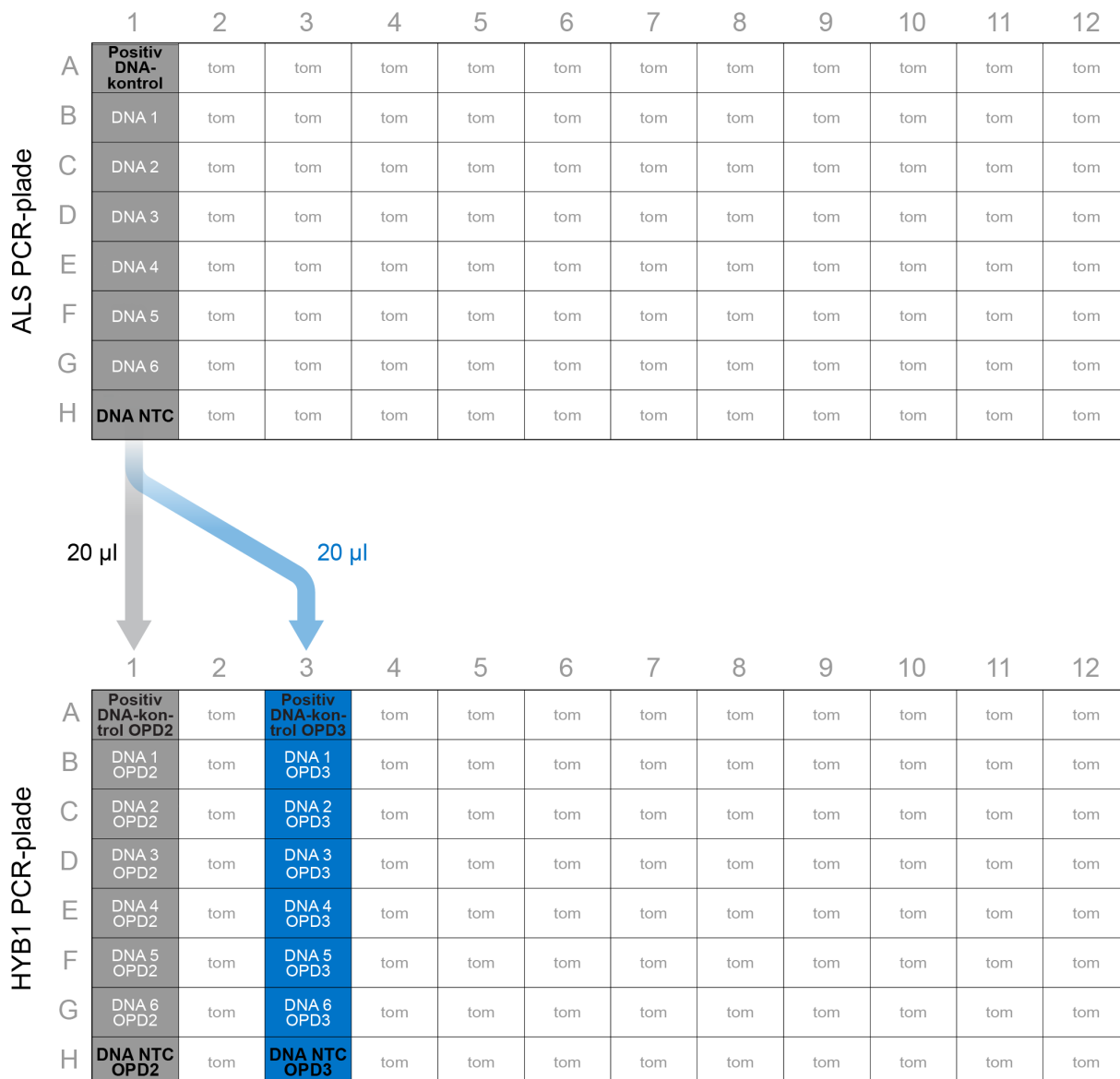
1. Klargør følgende reagenser.
 - TCB1 – Opvarm røret ved 37 °C i 5 minutter. Bland på vortexblander i 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

- Hvis ALS PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og centrifugeres ved 280 × g i 1 minut. Bland ved pipettering.
- Markér en ny 96-brønd PCR-plade HYB1 (Hybridisering 1).

Fremgangsmåde

- Overfør 20 µl af hvert gDNA-bibliotek fra ALS PCR-pladen til den tilsvarende brønd i HYB1 PCR-pladen til berigelse med OPD2-prober. Inkluder positive kontroller og NTC'er til berigelse med OPD2-prober.
- Overfør yderligere 20 µl gDNA-bibliotek fra ALS PCR-pladen til en anden brønd i HYB1 PCR-pladen til berigelse med OPD3-prober, som det fremgår af [Figur 3](#). Inkluder positive kontroller og NTC'er til berigelse med OPD3-prober.

Figur 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Eksempel på layout af første hybridiseringsplade



3. Påfør selvklæbende pladeforsegler til ALS PCR-pladen, og sæt den til side.
Forsigl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
4. Inspicér TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
5. Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
6. Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
7. Tilføj prober.
Kombiner *ikke* forskellige typer af prober. Tilføj kun ét probesæt pr. brønd.
 - **[DNA-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPD2 (hvidt låg) til hvert bibliotek afledt fra DNA.
 - **[DNA-HRD-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPD3 (blåt låg) til hvert bibliotek afledt fra DNA til HRD-berigelse.
8. Påfør selvklæbende pladeforsegler til HYB1 PCR-pladen.
Forsigl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
9. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
10. Placer på termocykler, og kørs HYB1-programmet.
Se [Programmer termocykler på side 35](#).
11. Hybridiser ved 57 °C i minimum 8 timer og maksimum 24 timer.
12. Sæt hybridiseringsreagenser tilbage i opbevaring.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

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

Tabel 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl) æske (delnummer 20140116)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SMB (mørkeblåt mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two
ET2	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Indfang Targets One Indfang Targets Two Normalisering af biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Konfigurer anden hybridisering

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Indfang Targets Two Oprens amplificeret, beriget bibliotek

Tabel 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20031121) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20140115)

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

Tabel 21 TruSight Oncology Comp Content Set æske (delnummer 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPD2 (hvidt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer anden hybridisering

Tabel 22 TruSight Oncology Comp HRD Content æske (delnummer 20140117)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPD3 (blåt låg)	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Konfigurer anden hybridisering

Indfang Targets One

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

Klargøring

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

3. Klargør frisk EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 23 EE2 + HP3-elueringsblanding til Indfang Targets One*

Komponent i elueringsblanding	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 28](#) for beregninger.

4. Bland EE2 + HP3-elueringsblanding, og centrifugér derefter kortvarigt. Sæt til side til trin [Eluér på side 49](#).
5. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP1 (Indfang 1).
6. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern HYB1 PCR-pladen fra termocyklern.
2. Centrifugér HYB1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
3. Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
Hvis der er bundfald, eller perlepelleten er til stede, skal du sørge for at nå stuetemperatur, pipettere op og ned for at frigøre pelleten og derefter blande for at resuspendere.
4. Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,05 ved portionsopdeling for at give tilstrækkeligt materiale per prøve.
5. Kassér eventuelt overskydende materiale efter tilføjelse af SMB til hver prøvebrønd.
6. Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra HYB1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP1 MIDI-pladen.
7. Kassér den tomme HYB1 PCR-plade.
8. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
9. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
10. Inkubér på en forvarmet mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
11. Placér CAP1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
12. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.



FORSIGTIG

Fortsæt straks til det næste trin ([Vask på side 49](#)). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

1. Vask perlerne, som følger.
 - a. Fjern CAP1 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
 - b. Tilføj 200 µl EEW til hver brønd.
 - c. Brug en pipette indstillet til 150 µl, og bland ved pipettering mindst 10 gange. Sørg for, at alle perler er resuspenderet.

Sørg for, at der ikke er perlepellets til stede ved forsigtigt at opsuge hele brøndens perleopløsning i spidsen. Efterse visuelt bunden af hver brønd. Hvis der forekommer en perlepellet, skråstil pipettespidsen mod perlepelleten under vasketrinnene for at løsne pelleten. Sørg for, at perlepelleten er helt nedsænket i opløsningen. Opløsningen bør være mørkebrun og have en homogen konsistens.
 - d. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
 - e. Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
 - f. Inkubér i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
 - g. Placér CAP1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
 - h. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.
3. Vask perlerne en **tredje** gang.
4. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EEW fra hver brønd.

Eluér

1. Fjern CAP1 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
2. Bland frisk EE2 + HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
3. Tilføj forsigtigt 17 µl EE2 + HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
4. Kassér resterende EE2 + HP3-elueringsblanding.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU1 (Eluering 1).
9. Bland ET2 på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
10. Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU1 PCR-plade.
11. Overfør forsigtigt 15 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU1 PCR-pladen.
12. Kassér den tomme CAP1 MIDI-plade.

13. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
14. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
15. Sæt EEW tilbage i opbevaring.

Konfigurér anden hybridisering

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

Klargøring

1. Klargør følgende reagenser.
 - TCB1 – Opvarm røret ved 37 °C i 5 minutter. Bland på vortexblander i 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - OPD3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Fremgangsmåde

1. Inspicér TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
2. Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i ELU1 PCR-pladen.
3. Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd.
4. Tilføj den samme sonde, der blev brugt under den første hybridisering, til hver brønd. Tilføj kun ét probesæt pr. brønd.
Kombinér *ikke* forskellige typer af prober.
 - **[DNA-biblioteksbrønde]** – Tilføj 5 µl OPD2 (hvidt låg) til hvert bibliotek afledt fra DNA.
 - **[DNA-biblioteksbrønde]** – 5 µl OPD3 (blåt låg) til hvert bibliotek afledt fra DNA til HRD-berigelse.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
6. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på termocykler, og kørs HYB2-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 35](#).
8. Hybridiser ved 57 °C i mindst 1,5 time og højst 4 timer.
9. Sæt hybridiseringsreagenser tilbage i opbevaring.

Indfang Targets Two

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

Klargøring

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

Tabel 24 EE2 + HP3-elueringsblanding til Indfang Targets Two*

Komponent i elueringsblanding	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 28](#) for beregninger.

4. Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt. Sæt til side til trin [Eluér på side 52](#).
5. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP2 (Indfang 2).
6. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern ELU1 PCR-pladen fra termocykleren.
2. Centrifugér ELU1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
3. Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
4. Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,05 ved portionsopdeling for at give tilstrækkeligt materiale per prøve.
5. Kassér eventuelt overskydende materiale efter tilføjelse af SMB til hver prøvebrønd.

- Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra ELU1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP2 MIDI-pladen.
- Kassér den tomme ELU1 PCR-plade.
- Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- Inkubér i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
Hvis du fortsætter med [Amplificér beriget bibliotek på side 54](#), skal du følge instruktionerne for optøning af reagenser i afsnit [Klargør til protokol](#).
- Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
- Bibehold CAP2 MIDI-pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

**FORSIGTIG**

Fortsæt straks til det næste trin ([Vask på side 52](#)). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

- Fjern CAP2 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
- Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
- Tilføj 200 µl RSB til hver brønd.
- Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
- Placér pladen på det magnetiske stativ i 2 minutter.
- Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
- Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende RSB fra hver brønd.

Eluér

- Fjern CAP2 MIDI-pladen fra det magnetiske stativ.
- Bland frisk EE2 + HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- Tilføj 22 µl EE2 + HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
- Kassér resterende EE2 + HP3-elueringsblanding.
- Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.

7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU2 (Eluering 2).
9. Bland ET2 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
10. Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU2 PCR-plade.
11. Overfør forsigtigt 20 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU2 PCR-pladen.
12. Kassér den tomme CAP2 MIDI-plade.
13. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
14. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
15. Sæt SMB, EE2, HP3, RSB og ET2 tilbage i opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ELU2 PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

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

Tabel 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20031121) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20140115)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PPC3	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur.	Amplificér beriget bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Hold afkølet.	Amplificér beriget bibliotek

Tabel 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl) æske (delnummer 20140116)

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

Amplificér beriget bibliotek

Dette trin anvender primere til at amplificere berigede biblioteker.

Klargøring

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

Fremgangsmåde

1. Bland PPC3 på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
2. Tilføj 5 µl PPC3 til hver biblioteksbrønd i ELU2 PCR-pladen.
3. Bland EPM på vortexblander i 5 sekunder, og centrifugér derefter kortvarigt.
4. Tilføj 20 µl EPM til hver biblioteksbrønd.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
6. Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en termocykler, og kørs EL-PCR-programmet.
Se [Programmér termocykler på side 35](#).
Hvis du fortsætter med [Normalisering af biblioteker på side 57](#), skal du følge instruktionerne for optøning i afsnittet [Klargør til protokol](#).
8. Sæt PPC3 og EPM tilbage i opbevaring.

Oprens amplificeret, beriget bibliotek

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

Klargøring

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

Tabel 27 Klargør frisk 80 % ethanol

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

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

Fremgangsmåde

Bind

1. Fjern ELU2 PCR-pladen fra termocyklern.
2. Centrifuger ELU2 PCR-pladen ved $280 \times g$ i 1 minut.
3. Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
4. Tilføj straks 110 µl SPB til hver biblioteksbrønd i BIND2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale per prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, efter at SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
5. Overfør 50 µl af hvert bibliotek fra ELU2 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND2 MIDI-pladen.
6. Kassér den tomme ELU2 PCR-plade.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
8. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
9. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
10. Placer BIND2 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
11. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

Vask

1. Vask perlerne, som følger.
 - a. Hold BIND2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en **ekstra** gang.
3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende EtOH fra hver brønd.
4. Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluér

1. Fjern BIND2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
2. Vend op og ned, eller brug vortexblander for at blande RSB.

3. Tilføj 32 µl RSB til hver biblioteksbrønd.
4. Påfør selvklæbende pladeforsegler til BIND2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
5. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
6. Inkubér ved stuetemperatur i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade PL (Oprensede biblioteker).
9. Overfør 30 µl af hvert eluat fra BIND2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PL PCR-pladen.
10. Kassér den tomme BIND2 MIDI-plade.
11. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen.
12. Sæt SPB og RSB tilbage i opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

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

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til det næste sikre stoppunkt.

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

Tabel 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20031121) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20140115)

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

Tabel 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl) æske (delnummer 20140116)

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

2. Hvis du fortsætter samme dag med [Klargør til sekventering på side 60](#), skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet Klargør til protokol.

Normalisering af biblioteker

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

Klargøring

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



FORSIGTIG

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

Tabel 30 LNA1 + LNB1-masterblanding*

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

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 28](#) for beregninger.

- Bland LNA1 + LNB1-masterblanding på vortexblander. Sæt til side til trin [Binding på side 58](#).

7. Klargør frisk EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 31 EE2 + HP3-elueringsblanding til normalisering af biblioteker*

Komponent i elueringsblanding	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

*Denne tabel omfatter overskud af volumen. Se [Håndtering af reagenser på side 28](#) for beregninger.

8. Bland frisk elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side til trin [Eluér på side 59](#).
9. Hvis PL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og centrifugeres ved 280 × g i 1 minut. Bland ved pipettering.
10. Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BBN (Perlebaseret normalisering).
11. Placér magneten.

Fremgangsmåde

Binding

1. Bland LNA1 + LNB1-masterblanding på vortexblander.
2. Tilføj straks 45 µl LNA1 + LNB1-masterblanding til hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen.
3. Kassér den resterende LNA1 + LNB1-masterblanding.
4. Tilføj 20 µl af hvert bibliotek fra PL PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BBN MIDI-pladen.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 30 minutter.
7. Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen, og sæt den tilbage til opbevaring.
8. Placér BBN MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
9. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.

Vask

1. Vask perlerne, som følger.
 - a. Fjern BBN MIDI-pladen fra det magnetiske holder.
 - b. Tilføj 45 µl LNW1 til hver biblioteksbrønd.
 - c. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 - d. Omryst ved 1800 o/min. i 5 minutter.

- e. Placér BBN MIDI-pladen i en magnetisk holder i 2 minutter.
- f. Hold pladen på det magnetiske stativ. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd.
2. Vask perlerne en *ekstra* gang.
3. Brug en pipette med fine spidser til at fjerne resterende supernatant fra hver brønd.

Eluér

1. Fjern BBN MIDI-pladen fra det magnetiske holder.
2. Bland frisk EE2 + HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Tilføj 32 µl EE2 + HP3-opløsning til hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen.
4. Kassér den resterende elueringsblanding.
5. Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
6. Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
7. Placér på en magnetisk holder i 2 minutter.
8. Markér en ny 96-brønds PCR-plade NL (Normaliserede biblioteker).
9. Overfør forsigtigt 30 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i NL PCR-pladen.



FORSIGTIG

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

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

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal NL PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25° C til -15 °C i op til 32 dage.

Klargør til protokol

Denne klargøring er nødvendig for at udføre protokoltrinnene op til sekventering.

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

1. Tag biblioteksfortyndingsbufferen (HT1) ud af opbevaring ved -25 °C til -15 °C. Optøs ved stuetemperatur. Hold afkølet efter optøning.
2. Følg forberedelsesinstruktionerne i *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for andre forbrugsvarer i sættet.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklusser)
3. Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (nedfrosset) æske (delnummer 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PhiX-kontrol	-25 °C til -15 °C	Optøs ved stuetemperatur. Hold afkølet efter optøning.	Klargør til sekventering

Tabel 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (køl) æske (delnummer 20031123) udover TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (køl) æske (delnummer 20140116)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Klargør til sekventering
RSB (pink etiket)	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur.	Klargør til sekventering

Klargør til sekventering

Hver DNA-sekventeringskørsel skal indeholde en positiv kontrol og en NTC. NTC'en sekventeres gentagne gange efter behov, således at hver kørsel indeholder en NTC. Hver kørsel inkluderer en separat, positiv kontrol.

Klargøring

1. Gennemgå retningslinjerne for [Antal biblioteker og valg af indekser på side 30](#).
2. Markér et mikrocentrifugerør dHP3 (fortyndet HP3).
3. Markér et mikrocentrifugerør dPhiX (fortyndet PhiX).
4. Forvarm en varmeblok til 96 °C til mikrocentrifugerør.
5. Klargør en isspand eller tilsvarende.

Fortynd og denaturér PhiX-kontrol

1. Bland HP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

2. Kombinér følgende volumener i dHP3-mikrocentrifugerørret.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Bland dHP3 på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
4. Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
5. Bland PhiX-kontrol på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
6. Kombinér følgende volumener i dPhiX-mikrocentrifugerørret.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX-kontrol
7. Tilføj 10 µl dHP3 til dPhiX-røret.
8. Kassér dHP3-røret.
9. Bland dPhiX-røret på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
10. Inkubér dPhiX ved stuetemperatur i 5 minutter for at denaturere.
11. Bland HT1 på vortexblander.
12. Tilføj straks 980 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til dPhiX.
13. Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
14. Placer dPhiX køligt indtil klargøring af den anden fortynding.
Den endelige koncentration er 20 pM dPhiX.
15. Sæt PhiX, HP3 og RSB tilbage i opbevaring.

Puljedannelse og denaturering af biblioteker

1. Hvis NL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøes til stuetemperatur, og derefter skal pladen centrifugeres ved $280 \times g$ i 1 minut.
2. Brug en multikanalpipette indstillet til 30 µl til forsigtigt at blande bibliotekerne i NL PCR-pladen 5 gange ved pipettering.
Brug friske spidser til hvert bibliotek.



FORSIGTIG

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

3. Markér et mikrocentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries – Samlede DNA-biblioteker).
4. Markér et mikrocentrifugerør PHL (Pooled HRD Libraries – Samlede HRD-biblioteker).
5. Overfør 10 µl af hvert normaliseret, OPD2-beriget DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
6. Overfør 10 µl af hvert normaliseret, OPD3-beriget DNA HRD-bibliotek fra NL-pladen til PHL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
7. Tilføj selvkæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.

8. Bland PDL- og PHL-rørene på vortexblander.
9. Centrifuger PDL- og PHL-rørene kortvarigt.
10. Inkubér PDL- og PHL-rørene i en varmekub ved 96 °C i 2 minutter.
11. Placer PDL- og PHL-rørene på is i 5 minutter.
12. Bland PDL- og PHL-rørene på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
13. Sæt PDL- og PHL-rørene tilbage på is.

Klargør første fortynding

1. Markér et mikrocentrifugerør DIL1 (Fortynding 1).
2. Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
3. Kassér PDL-røret.
4. Tilføj 5 µl PHL til DIL1.
5. Tilføj 475 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
6. Bland DIL1-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
7. Kassér PHL-røret.
8. **[Fejlfinding]** Hvis der efter sekventering observeres QC-fejl på kørselsniveau eller systemisk bibliotek i forbindelse med perlebaseret normalisering, skal du fortsætte til [Fejlfinding af arbejdsgang: Klargør justeret anden fortynding på side 63](#).

Klargør anden fortynding

1. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør DIL2 (Fortynding 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
3. Kassér DIL1-røret.
4. Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).
5. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
6. Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
7. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
8. Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.
9. Kassér DIL2-røret.
10. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar ved -25 °C til -15 °C i op til 32 dage.
11. Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.

Fejlfinding af arbejdsgang: Klargør justeret anden fortynding

Brug denne arbejdsgang til fejlfinding, når der observeres kørsels- eller systemiske biblioteks-QC-fejl i forbindelse med perlebaseret normalisering (se [Fejlfinding på side 68](#) for yderligere oplysninger).

Klyngedensiteter uden for området 170-220 K/mm² bør ikke justeres, medmindre de er forbundet med en QC-fejl. Når trinnet *Klargør første fortynding* er fuldført, skal der klargøres endnu en fortynding med de justerede DIL1- og HT1-volumener.

BEMÆRK Den justerede anden fortynding anvendes pr. biblioteksklargøring. Efter høj eller lav clusterdensitet forårsager henholdsvis en ugyldig sekventeringskørsel eller en ugyldig biblioteks-QC, kan efterfølgende kørsler fra samme biblioteksklargøring justeres med den samme clusterdensitetsværdi. Kørsler fra en ny biblioteksklargøring følger standardarbejdsgangen.

1. Anvend [Tabel 34](#) til at finde clusterdensitetsområdet (K/mm²), inklusive værdien observeret i sekventeringskørslen. Bemærk den tilsvarende justerede volumen af DIL1 (µl) og HT1 (µl). Den kombinerede reagensvolumen er altid 1700 µl, hvilket svarer til den nominelle fortyndingsvolumen.

Tabel 34 Volumenjusteringer baseret på klyngedensitet

Område for klyngedensitet (K/mm ²)	Volumen DIL1 (µl)	Volumen HT1 (µl)
≤ 50	199	1501
51-70	169	1531
71-90	123	1577
91-110	95	1605
111-130	76	1624
131-150	63	1637
151-169	53	1647
170-220	40	1660
221-240	31	1669
241-260	28	1672
261-280	25	1675
281-300	22	1678
≥ 300	21	1679

2. Markér et 2,0 ml mikrocentrifugerør TDIL2 (fejlfindingsfortynding 2).
3. Overfør volumen af DIL1 fra [Tabel 34](#) til det tomme TDIL2-rør.
4. Kassér DIL1-røret.
5. Tilføj volumen af forkølet HT1 fra [Tabel 34](#) til TDIL2-røret.

6. Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
7. Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til TDIL2-røret.
8. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
9. Tilføj 1300 µl TDIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.
10. Kassér TDIL2-røret.
11. Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar derefter ved -25 °C til -15 °C i op til 32 dage.
12. Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr. 1000000009513)* for yderligere oplysninger.

Tolkning af resultater

Sekventeringsresultaterne fra TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen rapporteres individuelt for hver prøve i en PDF-rapport og en JSON-rapport. Derudover genereres en rapport om lav dybde (`LowDepthReport.tsv`) på prøveniveauet.

På kørselsniveauet genereres følgende outputfiler:

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

Kun variationer, der består kvalitetskontrollen, vises i PDF- og JSON-rapporterne.

For detaljerede analyseoplysninger henvises til *Vejledning til arbejdsgang for analysemodulet (dokumentnr. 200080937) Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)*.

Resultater af ledsagende diagnosticering

Der er tre mulige resultater for hver erklæret formål for CDx:

- **Positiv** – En variation eller biomarkør er detekteret (CDx).
- **Ikke detekteret** – Der er ikke detekteret nogen variationer eller biomarkører tilknyttet den tiltænkte anvendelse af CDx i prøven. Den valgte cancertype for prøven er relevant for CDx.
- **Intet resultat** – Det er ikke muligt at fastslå en variation af biomarkører af én eller flere af de følgende årsager:
 - Sekventeringskørslen bestod ikke specifikationer for kvalitetskontrollen.
 - Biblioteket bestod ikke de påkrævede specifikationer for kvalitetskontrollen. For QC-kategorier, der bestod, blev der ikke påvist ledsagende diagnostiske variationer eller biomarkører.
 - Biblioteket bestod ikke de påkrævede NTC og specifikationer for positiv kontrol.

Alle CDx-resultater rapporteres i afsnittet Resultater af ledsagende diagnosticering i JSON-rapporten. Kun positive resultater angives i afsnittet Resultater af ledsagende diagnosticering i PDF-rapporten.

Kvalitetskontrol

Sekventeringskørsel, bibliotek og prøvevaliditet bestemmes automatisk og rapporteres af Analysemodulet TSO Comprehensive (EU, DRAGEN). Se [Tabel 35](#) og [Tabel 36](#) for de QC-målinger og specifikationer, der gælder for sekventeringskørsel, bibliotek og kontroller. Hvis den positive kontrol eller NTC ikke opfylder specifikationerne, ugyldiggør softwaren automatisk patientprøver baseret på kontrolprøveresultaterne. Se *Vejledning til arbejdsgang for analysemodulet (dokumentnr. 200080937) Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* for detaljerede analyseoplysninger. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-rapporten, der er tilgængelig i PDF- og JSON-formater, opsummerer resultater af kvalitetskontroller. Rapportfilerne findes i analysemappen. Se *Vejledning til arbejdsgang for analysemodulet (dokumentnr. 200080937) Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* for placeringen af analysemappen (indeholder PDF- og JSON-rapporter) og kørselsmappen.

Ugyldige sekventeringskørsler og biblioteker skal gentages. Se [Fejlfinding på side 68](#) for flere oplysninger om gentagelse af sekvenskørsler eller test af biblioteker. Foretag yderligere kvalitetskontrolmålinger i henhold til laboratoriets kvalitetsstyringssystem, i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale forordninger eller akkrediteringskrav.

Se [Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 21](#) for flere oplysninger om kvantificering af nukleinsyre og minimumskrav til inputmateriale.

Tabel 35 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-rapport med resultat af QC-målinger

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

Outputtype	Måling	Specifikation	Beskrivelse	Påvirkning fra specifikationsfejl*
DNA-biblioteker	CONTAMINATION_SCORE	≤ 1457	Kontamineringsscoren baseret på fordeling af variationsallelfrekvens (VAF) på SNP'er.	Ingen DNA-resultater rapporteret.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Prøvens mediane fragmentlængde	Ingen resultater rapporteret for små BRCA DNA-variationer.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (count)	≥ 150	Median exonfragmentdækning på tværs af alle exonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procentdel af exonbaser med 50X fragmentdækning.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Procentdel af kimæriske læsninger.	
	GENE_SCALED_MAD (count)	$0 \leq x \leq 0,134$	Medianen for absolutte afvigelser fra medianen af den normaliserede tælling for hvert CNV-målområde.	Ingen resultater for store BRCA-omlejring rapporteret.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (count)	$\geq 1,0$	Median rå bin-antal pr. CNV-mål.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	Procentdel af HRD-prober med 50X fragmentdækning.	
	EXCESSIVE_TF (count)	≤ 0	Fejltilstandsmåliger, der angiver, om tumorfraktionen er overdreven, og tumor og normale signaler ikke længere kan differentieres til beregning af GIS.	Intet GIS-resultat rapporteret.

* Vellykkede resultater indikeres med PASS (BESTÅET).

Tabel 36 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-rapport med resultat af kontrolmålinger

Outputtype	Måling	Specifikation	Påvirkning fra specifikationsfejl*
Positiv DNA-kontrol	Sensitivitet for små DNA-variationer	51 af 54 specificerede variationer blev detekteret	Softwaren ugyldiggør automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver. Ingen resultater rapporteret for små BRCA DNA-variationer.
	Sensitivitet for genamplifikation	3 af 3 specificerede variationer detekteret	Softwaren ugyldiggør automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver. Ingen resultater for store BRCA-omlejring rapporteret.
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50	Softwaren ugyldiggør automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver. Intet GIS-resultat rapporteret.
DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol)	MEDIAN_EXON_COVERAGE	≤ 8	Softwaren ugyldiggør automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver. Ingen resultater for lille BRCA DNA-variation og BRCA store omlejring rapporteret.
	MEDIAN_TARGET_COVERAGE	≤ 2	Softwaren ugyldiggør automatisk patientprøver baseret på resultater af kontrolprøver. Intet GIS-resultat rapporteret.

* Vellykkede resultater indikeres med PASS (BESTÅET).

Fejlfinding

Brug [Tabel 37](#) til fejlfinding af problemer i arbejdsgangen. Hvis en sekventeringskørsel eller klargøring af bibliotek mislykkes to gange, kan der være behov for yderligere fejlfinding. Kontakt Illumina teknisk support.

Før du foretager de anbefalede fejlfindingshandlinger, skal du overveje de to generelle kategorier af årsager til, at biblioteker ikke består specifikationerne for kvalitetskontrol (QC). Når DNA- biblioteker ikke består QC, er den underliggende årsag typisk enten *prøvespecifik* eller *brøndspecifik* eller *systemisk* for arbejdsgangen.

Prøve- eller brøndspecifikke fejl kan skyldes håndteringsfejl eller iboende prøve kvalitet. Systemiske fejl kan opstå som følge af brug, udstyr, reagenser eller reagenshåndtering, og disse kan påvirke flere biblioteker. Selvom systemiske fejl er mest sandsynlige, når alle biblioteker ikke består QC, kan variation i prøve kvaliteten resultere i systemiske fejl, der kun påvirker en delmængde af biblioteker eller et enkelt bibliotek.

Analysér følgende målinger for at identificere den sandsynlige kilde til det ugyldige resultat.

- Undersøg de samlede PF-læsninger (udvidet måling) for hvert bibliotek fra `MetricsOutput.tsv`. Ensartede værdier tyder på et systemisk problem, mens lave samlede PF-værdier for en eller få prøver – herunder de prøver, der ikke har bestået bibliotekskvalitetskontrollen – tyder på et problem med en bestemt prøve eller brønd.
- Undersøg de samlede PF-aflæsninger for den DNA-positive kontrol i `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>`, og sammenlign målingen med historiske værdier. En reduktion i denne måling for en positiv kontrol kan være tegn på et systemisk problem.

Hvis en sekventeringskørsel ikke består specifikationerne for kørselskvalitetskontrol, er årsagen en systemisk fejl.

Tabel 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Fejlfinding

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Sekventeringskørslen lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol af kørslen.	- Puljefejl - Fortyndingsfejl - Problemer med klargøring af sekventeringsmaterialer (f.eks. ikke optøet tilstrækkeligt, kondensering/debris på gennemstrømningscelle)	Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 60 .
	Perlebaseret normalisering: høj klyngedensitet	Hvis der er mistanke om en angivet fejl, skal problemet rettes, og bibliotekerne skal sekventeres fra PCR-pladen Normaliserede biblioteker (NL). Se Klargør til sekventering på side 60. Hvis der ikke er mistanke om nogen af de andre anførte fejl, kan koncentrationen af perler fra LNB1-reagensrøret have forårsaget høj klyngedensitet. Dette kan skyldes utilstrækkelig perleblanding. Find klyngedensitetsværdien fra <code>RunCompletionStatus.xml</code> i kørselsmappen. Det optimale klyngedensitetsområde er 170-220 K/mm², men højere værdier kan stadig producere kørsler, der opfylder QC-specifikationerne. Hvis klyngedensiteten er over det optimale område, og sekventeringskørslen ikke bestod QC-specifikationerne, kan bibliotekerne fra PCR-pladen Normaliserede biblioteker (NL) resekventeres med og justeres til den anden fortynding. Gentag Klargør til sekventering på side 60, og følg instruktionerne for fejlfinding.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Fejl med rapportgenerering eller generel instrumentfejl (netværksfejl, fejl ved isætning/fjernelse af reagenser, osv.).	Software- eller instrumentfejl.	Se <i>Vejledning til arbejdsgang for analysemodulet (dokumentnr. 200080937) Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> for hjælp til generering af rapporter. Kontakt Illumina teknisk support, hvis du har brug for yderligere hjælp.
DNA-biblioteket lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol.	Krav til prøveinput blev ikke overholdt.	Sørg for relevant prøveinput, og gentag klargøring af bibliotek fra trinnet Fragmentér gDNA. Se Krav til prøver på side 21 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 21 .
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen.	Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illumina teknisk support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. • Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 60. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Fragmentér gDNA på side 36.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
DNA-biblioteket lever ikke op til specifikationer for kvalitetskontrol (fortsat).	Kriterier for CONTAMINATION_SCORE er ikke opfyldt.	Se Advarsler og forsigtighedsregler for oplysninger om, hvordan du undgår krydskontaminering. Gennemgå pladelayout og biblioteksindeksering for at sikre, at prøverne med samme indeks ikke blev sekventeret sammen. For de prøver, der er påvirket, skal du starte klargøring af bibliotek fra arbejdsgangens begyndelse. Se Fragmentér gDNA på side 36 . Kontaminering kan være opstået under ekstraktion af prøven. Det kan være nødvendigt at gentage ekstraktion for at sikre, at prøven ikke er kontamineret.
	Prøven kan være overfragmenteret, eller nukleinsyren kan være beskadiget, hvilket påvirker evnen til at generere tilstrækkelige unikke biblioteker.	Gennemgå Konfigurationsindstillinger for ultrasonikator til DNA-fragmentering på side 18 og producenten af ultrasonikatorens indstillinger for brug og drift (herunder vandniveau og rørtype). Sørg for det korrekte prøveinput i analysen. Se Krav til prøver på side 21 og Nukleinsyreekstraktion, kvantificering og opbevaring på side 21 . Det kan være nødvendigt at tage en ny prøve og/eller gentage trinnet Fragmentér gDNA, hvis prøven er overfragmenteret eller beskadiget.
	• Puljefejl. • Fortyndingsfejl. • Ufuldstændig varmedenaturering af PDL/PHL.	Udeluk ovenstående DNA-relaterede årsager (f.eks. prøveinput, prøvekvalitet, udstyr). Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 60 .

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
DNA-biblioteket lever ikke op til specifikationer for kvalitetskontrol (fortsat).	Perlebaseret normalisering (lav klyngedensitet).	Hvis der ikke er mistanke om nogen af de andre mulige årsager til QC-fejl på biblioteket, kan koncentrationen af perler fra LNB1-reagensrøret have forårsaget lav klyngedensitet på grund af utilstrækkelig blanding. Find og registrer klyngedensitetsværdien fra <code>RunCompletionStatus.xml</code> i kørselsmappen. Hvis klyngedensiteten er under 170 K/mm ² , og der er mistanke om en systemisk perlebaseret normalisering (herunder evidens fra samlede PF-aflæsninger for de positive kontroller), skal bibliotekerne gensekvenseres fra PCR-pladen Normaliserede biblioteker (NL), og instruktionerne for en justeret anden fortynding skal følges. Se Klargør til sekventering på side 60 og Fejlfinding af arbejdsgang: Klargør justeret anden fortynding på side 63 .
	Fejl i arbejdsgang for biblioteksklargøring under eller før indeks-PCR-trin.	Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Fragmentér gDNA på side 36 .
	- Forkert brug af berigelsesprober. - Fejl i arbejdsgang for biblioteksklargøring under eller efter første hybridiseringstrin.	En fejl i den systemiske probepulje (f.eks. udskiftning af probepuljer) kan resultere i normale totale forbipasserende filterlæsninger, men QC af median exondækning mislykkes. Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Fragmentér gDNA på side 36 .

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Fejl ved positiv kontrol.	Krav til prøveinput for den positive kontrol blev ikke overholdt.	Sørg for korrekt input i analysen. Gennemgå pladelayout, og sørg for, at korrekte reagenser (prober, indekser) er i de korrekte brønde. Sørg for, at den positive kontrol opbevares i henhold til mærkatet. For alle prøver, der deler den positive kontrol, gentages klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illumina teknisk support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. • Sekventér bibliotekerne fra PCR-pladen med normaliserede biblioteker (NL) igen. Se Klargør til sekventering på side 60. • Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Fragmentér gDNA på side 36.
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen.	
NTC-fejl.	Krydskontaminering opstod, eller arbejdsområdet er kontamineret.	Se afsnittet Advarsler og forholdsregler for oplysninger om dekontaminering af arbejdsområdet og forhindring af krydskontaminering. Gennemgå pladelayout og biblioteksindeksering for at sikre, at prøverne med samme indeks ikke blev sekventeret sammen. Gentag klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen for alle biblioteker, der deler ingen skabelonkontrol.
	Forkert indeksering af bibliotek.	

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Positive og/eller negative kontroller i sekventeringskørslen blev analyseret som ikke-kontrolprøver.	Forkert tildeling af prøvetype under opsætning af sekventeringskørsel.	Genaktivér analyse med kontroller, der er korrekt identificeret som angivet i "Vejledning til arbejdsgang for analysemodul" (se <i>Vejledning til arbejdsgang for analysemodul</i> (dokumentnr. 200080937) <i>Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i>).

Karakteristika for ydeevne

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er en analyse, som gør det muligt at vurdere HRD ved hjælp af DNA ekstraheret fra FFPE-tumorstøvsprøver fra patienter med æggestokkræft. Den bruger to NGS-paneler. Et panel anvendes til påvisning af skadelige og formodede skadelige ændringer i BRCA1- og BRCA2-gener, herunder små DNA-varianter og store omlejninger. Et andet NGS-panel bruges til at måle genomisk ustabilitet, der rapporteres som en GIS. BRCA-positiv defineres som påvisning af en skadelig eller formodet skadelig ændring i enten BRCA1- eller BRCA2-gener. GIS-positiv defineres som GIS $\geq$ 42. HRD-positiv defineres som BRCA-positiv og/eller GIS-positiv.

FFPE-prøver med specifikke CDx-positive variationer blev inkluderet i undersøgelserne.

Dobbeltsidede 95 % konfidensintervaller (CI) beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden, medmindre andet angives.

Tabel 38 angiver definitioner på målinger beregnet i forskellige studier.

Tabel 38 Definitioner på målinger

Udtryk	Definition
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA)	Procentdelen af positive resultater for sammenligningsmetoden, hvor TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er positiv.
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA)	Procentdelen af negative resultater for sammenligningsmetoden, hvor TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er negativ.
Procentdel af positive bestemmelser (PPC)	Procentdelen af observationer, der er positive for et mål blandt observationer, der forventes at være positive for målet.
Procentdel af negative bestemmelser (PNC)	Procentdelen af observationer, der er negative for et mål blandt observationer, der forventes at være negative for målet.
n/N	Antallet af positive eller negative observationer (n) divideret med de samlede observationer (N) for at beregne henholdsvis PPC eller PNC. Værdierne for n og N kan være på forskellige niveauer (f.eks. variant eller gen) eller kombineres på tværs af en gruppe (f.eks. SNV'er).
Standardafvigelse (SD)	Et mål for mængden af variation af værdierne af en variabel om dens middelværdi.
Procent variationskoefficient (%CV)	Standardafvigelse divideret med middelværdien som en procentdel.

Nøjagtighed

Nøjagtigheden af TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen til påvisning af HRD hos patienter med æggestokkræft blev påvist ved at vurdere overensstemmelsen mellem HRD-status, GIS-status og BRCA-statusresultater mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og en valideret NGS-baseret komparatoranalyse. Nøjagtigheden blev estimeret i forhold til den ortogonale metode, PPA, NPA og det tilknyttede tosidede 95 % Wilson Score CI blev beregnet.

Der blev testet 175 æggestokkræft FFPE-DNA-prøver med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og den ortogonale metode. Én prøve havde ugyldige TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater, og en anden prøve havde ugyldige komparatoranalyseresultater. Det evaluerbare datasæt for GIS- og HRD-status var 173 prøver. Det evaluerbare datasæt for BRCA-status var 169 på grund af udelukkelse af fire yderligere prøver med BRCA-variationer uden for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens måleområde.

Overensstemmelsesanalyserne på baggrund af gyldige testresultater vises i [Tabel 39](#), [Tabel 40](#) og [Tabel 41](#).

Tabel 39 Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og sammenligningsmetoden til påvisning af HRD-status

		Resultat af sammenligningsmetode		
		HRD-positiv	HRD-negativ	I alt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseresultat	HRD-positiv	97	6	103
	HRD-negativ	6	64	70
	I alt	103	70	173
Statistisk overensstemmelse	PPA % (n/N; 95 % CI)	94,2 % (97/103; 87,9 %, 97,3 %)		
	NPA % (n/N; 95 % CI)	91,4 % (64/70; 82,5 %, 96,0 %)		

Tabel 40 Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og sammenligningsmetoden til påvisning af GIS-status

		Resultat af sammenligningsmetode		
		GIS-positiv	GIS-negativ	I alt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseresultat	GIS-positiv	95	3	98
	GIS-negativ	6	69	75
	I alt	101	72	173
Statistisk overensstemmelse	PPA % (n/N; 95 % CI)	94,1 % (95/101; 87,6 %, 97,2 %)		
	NPA % (n/N; 95 % CI)	95,8 % (69/72; 88,5 %, 98,6 %)		

Tabel 41 Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og sammenligningsmetoden til påvisning af BRCA-status

		Resultat af sammenligningsmetode		
		BRCA-positiv	BRCA-negativ	I alt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseresultat	BRCA-positiv	40	8	48
	BRCA-negativ	2	119	121
	I alt	42	127	169
Statistisk overensstemmelse	PPA % (n/N; 95 % CI)	95,2 % (40/42; 84,2 %, 98,7 %)		
	NPA % (n/N; 95 % CI)	93,7 % (119/127; 88,1 %, 96,8 %)		

Reproducerbarhed

Reproducerbarheden og repeterbarheden af TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen blev evalueret på tværs af tre eksterne teststeder med to operatører pr. sted, to replikater inden for kørsler, tre partier og på tre ikke-sammenhængende dage. På hvert af de tre steder udførte to operatører uafhængigt testning på separate NextSeq 550Dx-instrumenter. Testen blev udført med et reproducerbarhedspanel på 27 elementer, der indeholder DNA ekstraheret fra FFPE-vævsprøver fra ovarier med kendte BRCA1- og BRCA2-mutationer og/eller GIS.

Af de 27 panelelementer blev 16 panelelementer målrettet mod små DNA-varianter i BRCA-gener, der omfatter: SNV'er, variationer i homopolymerområder ≥ 5 bp, indsætninger eller sletninger < 10 bp og indsætninger eller sletninger ≥ 10 bp. For BRCA LR-varianttypen blev to panelelementer anvendt til BRCA LR-varianter < 3 exoner og et panelelement til BRCA LR-varianter ≥ 3 exoner. For GIS repræsenterede tre panelelementer statusen Høj GIS (+), tre panelelementer repræsenterede GIS (-), to panelelementer repræsenterede Lav GIS (+), og et af de panelelementer, der allerede repræsenterede LR-varianterne på < 3 exon-niveau, repræsenterede også et element med statusen Lav GIS (+). På hvert center testede hver operatør panelelementerne i løbet af tre dage, der ikke kom lige efter hinanden, og genererede seks observationer pr. mål pr. panelelement. Fra alle tre steder blev der genereret 36 observationer per panelelement (tre steder $\times$ to operatører/instrumenter $\times$ tre dage $\times$ to replikater i samme kørsel).

PPC og PNC for målrettede panelmedlemmer blev bestemt. Der blev udført analyser for at estimere PPC og PNC (med tilhørende 95 % konfidensintervaller) ved at sammenlægge resultaterne fra seks operatører på tre lokaliteter. For hver målrettet lille DNA-variation og LR-variation blev TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseobservationer i panelelementer, der forventedes at være negative for den målrettede variation, kombineret for at beregne PNC. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseobservationer i GIS-panelementer (-) blev kombineret for at beregne PNC for GIS-panelementer (-).

Små DNA-varianter i BRCA

PPC-værdier for både højniveau ($2-3 \times C95$) og lavniveau ($1-1,5 \times C95$) små BRCA DNA-variationspanelementer var alle 100 % (Tabel 42). PNC-værdier for panelementer med små BRCA DNA-varianter var også alle 100 % (Tabel 43).

Tabel 42 PPC for målrettede små BRCA DNA-varianter efter variationsniveau og variationsklasse

Variationsniveau	Variantklasse	Målrettet variation	Gennemsnitlig VAF	PPC (%) (n/N)	95 % CI
Høj	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0.129	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Variationer i homopolymerer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.248	100 (34/34)	(89,8, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.239	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Indsætning eller sletning (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0,166	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.153	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Indsætning eller sletning (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0.141	100 (33/33)	(89,6, 100)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0.087	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0.087	100 (36/36)	(90,4, 100)
Lav	Variationer i homopolymerer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.147	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.142	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Indsætning eller sletning (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.122	100 (35/35)	(90,1, 100)
	Indsætning eller sletning (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.109	100 (35/35)	(90,1, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,111	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabel 43 PNC for målrettede små BRCA DNA-varianter efter variationsklasse

Variantklasse	Målrettet variation	PNC (%) (n/N)	95 % CI
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)
Variationer i homopolymerer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	100 (566/566)	(99,3, 100)
	BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	100 (492/492)	(99,2, 100)
Indsætning eller sletning (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)
Indsætning eller sletning (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

Tabel 44 viser varianskomponentanalysen efter variationskilde for høje og lave niveauer for hver klasse af små BRCA DNA-varianter. Den gennemsnitlige VAF på tværs af de målrettede små BRCA DNA-varianter på højt niveau varierede fra 0,121 til 0,248, og målrettede små BRCA DNA-varianter på lavt niveau varierede fra 0,087 til 0,147. Den samlede SD på tværs af de målrettede små BRCA DNA-varianter varierede fra 0,019 (11,4 % CV) til 0,041 (28,7 % CV) for små BRCA DNA-varianter på højt niveau og fra 0,016 (18,9 % CV) til 0,043 (30,1 % CV) for små BRCA DNA-varianter på lavt niveau.

Tabel 44 Varianskomponentanalyse af VAF i målrettede små BRCA DNA-varianter

Variationsniveau	Variantklasse	Målrettet variation	N	Gennemsnitlig VAF	SD for sted (% CV)	Operator- /instrument- SD (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for parti (% CV)	SD for repeterbarhed (%CV)	SD i alt (%CV)
Høj	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0.129	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (5,5)	0,000 (0,0)	0,020 (15,4)	0,021 (16,3)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.121	0,007 (5,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,023 (19,2)	0,024 (19,9)
	Homopolymervariationer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	34	0.248	0,000 (0,0)	0,011 (4,3)	0,008 (3,3)	0,000 (0,0)	0,025 (10,1)	0,029 (11,5)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.239	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,000 (0,0)	0,041 (17,0)	0,041 (17,1)
	Indsætning eller sletning < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0,166	0,006 (3,7)	0,005 (3,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,3)	0,019 (11,4)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	36	0.153	0,008 (5,1)	0,000 (0,0)	0,013 (8,5)	0,000 (0,0)	0,020 (12,9)	0,025 (16,3)
	Indsætning eller sletning ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	36	0.189	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (3,3)	0,015 (8,0)	0,033 (17,5)	0,037 (19,6)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	33	0.141	0,000 (0,0)	0,013 (9,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,038 (27,1)	0,041 (28,7)

Variationsniveau	Variantklasse	Måltrettet variation	N	Gennemsnitlig VAF	SD for sted (% CV)	Operator- /instrument- SD (%CV)	SD for dage (%CV)	SD for parti (% CV)	SD for repeterbarhed (%CV)	SD i alt (%CV)
Lav	SNV	BRCA1 p. (A1708E)	36	0.087	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,016 (18,7)	0,016 (18,9)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.087	0,003 (3,7)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (22,0)	0,019 (22,3)
	Homopolymervariationer ≥ 5 bp	BRCA2 p. (E2981Rfs*37)	36	0.147	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,021 (14,0)	0,021 (14,1)
		BRCA1 p. (R1726Kfs*3)	36	0.142	0,011 (8,0)	0,000 (0,0)	0,010 (7,2)	0,015 (10,7)	0,037 (26,0)	0,043 (30,1)
	Indsætning eller sletning < 10 bp	BRCA1 p. (A1279Hfs*28)	36	0.121	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (3,7)	0,017 (14,0)	0,017 (14,5)
		BRCA1 p. (Q1756Pfs*74)	35	0.122	0,004 (3,4)	0,007 (5,6)	0,000 (0,0)	0,006 (5,0)	0,021 (16,9)	0,023 (18,8)
	Indsætning eller sletning ≥ 10 bp	BRCA1 p. (C994Sfs*7)	35	0.109	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (6,5)	0,006 (5,5)	0,026 (24,3)	0,028 (25,8)
		BRCA2 p. (E1811Kfs*3)	36	0.111	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,029 (26,0)	0,030 (27,2)

Store omlejringsvariationer i BRCA

PPC-værdier for de målrettede BRCA LR'er var 100 % (29/29) for BRCA2 LR ≥ 3 exoner, 97,2 % (35/36) for BRCA2 LR < 3 exoner og 94,3 % (33/35) for BRCA1 LR < 3 exoner ([Tabel 45](#)). PNC-værdier for de målrettede BRCA LR'er var 98,9 % (630/637) for BRCA1 og 100 % (607/607) for BRCA2 ([Tabel 46](#)).

Tabel 45 PPC for målrettede BRCA LR'er efter variantklasse

Variantklasse	Måltrettet variation	Gennemsnitlig VAF	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
LR ≥ 3 exoner	BRCA2 TAB	0.448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 exoner	BRCA2 TAB	0.602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	BRCA1 TAB	0.680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tabel 46 PNC for målrettede BRCA LR'er

Måltrettet variation	PNC (%) (n/N)	95 % CI*
BRCA1 TAB	98,9 (630/637)	(97,7, 99,5)
BRCA2 TAB	100 (607/607)	(99,4, 100)

[Tabel 47](#) viser varianskomponentanalysen efter variationskilde for hver BRCA LR-klasse. Den gennemsnitlige VAF for LR ≥ 3 exon-variationen var 0,448 med en samlet SD på 0,026 (5,7 % CV). Den gennemsnitlige VAF for LR < 3 exon-variationer varierede fra 0,602 til 0,680, og den samlede SD varierede fra 0,038 (6,3 % CV) til 0,079 (11,6 % CV).

Tabel 47 Varianskomponentanalyse af VAF i målrettede BRCA LR'er

Variantklasse	Målrettet variation	N	Gennemsnitlig VAF	SD for sted (% CV)	Operator/ Instrument SD (% CV)	SD for dag (% CV)	SD for parti (% CV)	Repeterbarhed SD (% CV)	SD i alt (%CV)
LR ≥ 3 exoner	BRCA2 TAB	29	0.448	0,000 (0,0)	0,005 (1,1)	0,013 (2,9)	0,000 (0,0)	0,022 (4,8)	0,026 (5,7)
LR < 3 exoner	BRCA2 TAB	36	0.602	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,015 (2,5)	0,000 (0,0)	0,035 (5,8)	0,038 (6,3)
	BRCA1 TAB	35	0.680	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,048 (7,1)	0,000 (0,0)	0,062 (9,2)	0,079 (11,6)

Genomisk ustabilitetsscore (GIS)

PPC-værdierne var 100 % for panelelementer med høj GIS (+). Lave GIS (+) panelelementer havde PPC-værdier fra 94,4 % til 100 % (Tabel 48). PNC-værdierne var 100 % på tværs af alle GIS (-) panelelementer (Tabel 49).

Tabel 48 PPC for GIS efter målrettet GIS-status og panelelement

Målrettet GIS-status	Målrettet GIS	Gennemsnitlig GIS	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
Høj GIS (+)	69.8	70.2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	59.5	60.1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	63.7	61.7	100 (36/36)	(90,4, 100)
Lav GIS (+)	47.2	46.3	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	52.7	53.1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	53.0	52.5	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabel 49 PNC for GIS-negative målrettede panelelementer

Målrettet GIS-status	Målrettet GIS	Gennemsnitlig GIS	PNC (%) (n/N)	95 % CI*
GIS (-)	24.5	23.3	100 (36/36)	(90,4, 100)
	(19,2)	18,2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	19.5	21.0	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabel 50 viser varianskomponentanalysen efter variationskilde for hvert målrettet panelelement med høj GIS (+), lav GIS (+) og GIS (-). Den gennemsnitlige GIS på tværs af de målrettede GIS-panelementer varierede fra 60,1 til 70,2 for høj GIS (+), fra 46,3 til 53,1 for lav GIS (+) og fra 18,2 til 23,3 for GIS (-). Den samlede SD på tværs af de målrettede GIS-panelementer varierede fra 2,5 (3,5 % CV) til 3,2 (5,2 % CV) for høj GIS (+), fra 1,5 (2,9 % CV) til 3,8 (7,2 % CV) for lav GIS (+) og fra 2,5 (11,7 % CV) til 3,3 (14,1 % CV) for GIS-panelementer (-).

Tabel 50 Varianskomponentanalyse af GIS i målrettede panelelementer

Målrettet GIS-status	Målrettet GIS	N	Gennemsnitlig GIS	SD for sted (% CV)	Operatør/ Instrument SD (% CV)	SD for dag (% CV)	SD for parti (% CV)	Repeterbarhed SD (% CV)	SD i alt (%CV)
Høj GIS (+)	69.8	36	70.2	0,0 (0,0)	1,2 (1,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,2 (3,1)	2,5 (3,5)
	59.5	36	60.1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (1,7)	0,0 (0,0)	2,7 (4,4)	2,8 (4,7)
	63.7	36	61.7	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,9 (1,5)	0,0 (0,0)	3,1 (5,0)	3,2 (5,2)
Lav GIS (+)	47.2	36	46.3	0,0 (0,0)	1,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,7 (1,6)	2,8 (6,1)	3,4 (7,3)
	52.7	36	53.1	0,9 (1,7)	1,2 (2,3)	0,0 (0,0)	0,4 (0,8)	3,5 (6,5)	3,8 (7,2)
	53.0	36	52.5	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,5 (2,9)	1,5 (2,9)
GIS (-)	24.5	36	23.3	0,9 (3,7)	1,6 (6,9)	1,6 (7,0)	0,9 (3,7)	2,0 (8,7)	3,3 (14,1)
	(19,2)	36	18,2	0,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,6 (3,5)	0,1 (0,4)	2,4 (13,4)	2,6 (14,4)
	19.5	36	21.0	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,6 (3,0)	1,3 (6,3)	2,0 (9,4)	2,5 (11,7)

Blindgrænse

Andelen af falske positive resultater (ud af det samlede antal forventede negative resultater) blev vurderet ved gentagne test af FFPE-præparater af godartet tilstødende æggestokkvæv. Vævet forventedes at være GIS-negativt og ikke indeholde skadelige eller formodede skadelige BRCA1- og BRCA2-mutationer (små DNA-variationer og LR'er). Syv godartede FFPE DNA-prøver fra æggestokke blev kørt i duplikat med to operatører over tre dage for hver af de to reagenslots i 8-plex-format. Et undersæt af prøver blev samlet i en ny pulje og sekventeret igen i et 3-plex-format for at evaluere falsk positive med flere multipleks-konfigurationer understøttet af denne enhed. I alt fandtes der 168 mulige observationer. Procentdelen af falsk positive blev beregnet på positionsniveau for små BRCA DNA-variationer (ca. 3 millioner positioner), på genniveau for BRCA LR'er og på prøveniveau for GIS. Procentdelen af falsk positive resultater per varianttype vises i [Tabel 51](#).

Tabel 51 Falsk positive efter varianttype

Varianttype	Falsk positive resultater*
Små BRCA DNA-variationer	0 % (0/3.076.657)
BRCA LR	0 % (0/384)
GIS	0 % (0/192)

* Denominatorerne er summen af 8-plex- og 3-plex-kørsler.

Detektionsgrænse

Påvisningsgrænsen (LoD) for små BRCA DNA-variationer (SNV'er, indsættelser eller sletninger ≥ 10 bp, indsættelser eller sletninger < 10 bp, variationer i homopolymerregioner ≥ 5 bp), BRCA LR'er < 3 exoner og ≥ 3 exoner og GIS blev bestemt i FFPE DNA-kræftprøver. LoD er den laveste analytværdi, som kan detekteres konsekvent (95 % hitrate eller en type II-fejl på 5 %). LoD for GIS blev defineret som det laveste tumorindhold, der opnår ≥ 95 % GIS-påvisning, og for små BRCA DNA-variationer og LR'er som variationsallelfrekvens (VAF). FFPE-DNA-prøver for æggestokkræft blev anvendt til små BRCA DNA-variationer, GIS og BRCA LR ≥ 3 exoner.

En FFPE DNA-prøve for brystcancer blev anvendt til BRCA LR < 3 exoner på grund af utilgængeligheden af FFPE-væv for æggestokkræft. Prøverne blev fortyndet til flere testniveauer med 12 observationer for hvert testniveau pr. reagenslot pr. variation, genereret af flere operatører på tre ikke-sammenhængende dage, ved hjælp af to reagenslots. Den største LoD på tværs af de to reagenspartier blev taget som detekteringsgrænsen for variationen (Tabel 52).

Tabel 52 Detektionsgrænse for små BRCA DNA-varianter, BRCA LR'er, GIS

Varianttype	Variantklasse	C95
Små BRCA DNA-varianter	SNV	0,05 VAF
	Indsættelser eller sletninger ≥ 10 bp	0,06 VAF
	Indsættelser eller sletninger < 10 bp	0,07 VAF
	Variationer i homopolymer region ≥ 5 bp	0,07 VAF
BRCA store omlejninger	LR < 3 exoner	0,61 VAF
	LR ≥ 3 exoner	0,46 VAF
GIS	GIS	33 % tumorindhold

Interfererende stoffer

Påvirkningen af potentielle endogene og eksogene stoffer på ydeevnen af TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen blev evalueret med det endogene stof (hæmoglobin), der blev tilsat til prøver under nukleinsyreekstraktionsprocessen, samt eksogene stoffer (ethanol, proteinase K, vaskebuffer, paraffin, xylene og overskydende indeksprimere), der blev tilsat til den oprensede nukleinsyre inden biblioteksklargøring. Der blev genereret fire replikater af prøvebibliotekerne af en eller flere operatører. For alle stoffer blev der anvendt 10 FFPE-prøver for ovariecancer til analyse af små BRCA DNA-varianter, BRCA LR'er og GIS. Effekten af nekrose blev også vurderet på et andet sæt af tre FFPE-prøver for ovariecancer med et område af nekrotisk væv (10 %-20 %). En makrodissekeret kontrol uden nekrose var inkluderet for hver nekroseprøve. Der blev behandlet fire replikater af DNA-biblioteker og deres kontroller sammen. For alle interferenter blev prøvereplikater pr. stof sammenlignet med deres respektive kontrolreplikater. Hæmoglobin (4 mg/ml), ethanol (5 %), Proteinase K (2x repræsentativ ekstraktionsmetodekoncentration), vaskebuffer (2,5 %), paraffin (25 % af det homogeniserede fordøjede væv), xylene (0,0001 %), indeksprimere (30 % overskud) interfererer ikke med påvisningen af små BRCA DNA-varianter, BRCA-LR'er og GIS. VAF-niveauer for små BRCA DNA-varianter og GIS blev ikke påvirket af tilstedeværelsen af nogen af de testede interferenter. Tilstedeværelsen af nekrotisk væv op til 20 % interfererede ikke med små BRCA DNA-varianter og GIS. BRCA LR'er blev ikke evalueret for nekrose på grund af utilgængeligheden af en FFPE-prøve for nekrotisk æggestokkekræft med en BRCA LR-variant.

Sikkerheden for titreringsinput af nukleinsyre

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kræver et fast input på 40 ng DNA-prøve. Analysens ydeevne blev evalueret ved hjælp af ni DNA-prøver ekstraheret fra FFPE-væv fra æggestokke, for at fastlægge tolerancer for variation i nukleinsyreinput, som kan føre til analysefejl eller negativ indvirkning på analysen. Hver FFPE-prøve indeholdt en eller flere små BRCA DNA-varianter, BRCA LR'er eller GIS, og blev testet ved fem inputniveauer (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominel], 60 ng og 100 ng) i tredobbelt kørsel. Resultaterne viste, at detektion af en lille BRCA DNA-variation, bestemmelse af BRCA LR og GIS-status ikke blev påvirket af forskelle i inputmængde.

Resultaterne viste også, at nukleinsyreinput to gange under den nominelle tilstand gav et øget antal QC-fejl, hvilket førte til færre prøver, der blev evalueret til variationsbestemmelse. På inputniveauet med 20 ng blev der opnået en biblioteksvaliditetsrate på 55,5 % på grund af fejl i procentvis exondækning ved 50X (PCT_EXON_50X) og median exondækning (MEDIAN_EXON_COVERAGE). Lille BRCA DNA-variant VAF og GIS blev ikke påvirket ved inputniveauet på 20 ng.

Krydskontaminering

Krydskontamineringsforsøget blev udført for at evaluere, om falsk-positiv-resultater skyldtes brønd-til-brønd-kontaminering under klargøring af prøvebibliotek samt kørsel-til-kørsel-kontaminering mellem konsekutive sekventeringskørsler. Analysen blev udført for små BRCA DNA-varianter, BRCA LR og GIS. Biblioteker blev klargjort med karakteriserede prøver af FFPE æggestokkræft i et skakbrætdesign med skiftende prøver for at evaluere brønd-til-brønd-kontaminering og med skiftende indekser for at evaluere kontaminering mellem sekvenskørsler ved konsekutiv sekventering på det samme NextSeq 550Dx-instrument. Krydskontamineringsforsøget viste en kontamineringsrate på 0,8 % (2/252 kontamineringshændelser) ved undersøgelse af de detekterede variationer i hver prøve. Der blev ikke fundet nogen kontamineringshændelser ved at analysere modtagerbiblioteker baseret på variationsbestemmelse af små BRCA DNA-varianter og BRCA LR. De to observerede kontamineringshændelser var falsk positive for GIS i GIS-modtagerprøver på grund af iboende GIS-variation, og GIS for disse to prøver var tæt på beslutningstærsklen.

Forsøget viste, at TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyse forventes at have en lav forekomst af krydskontaminering fra brønd-til-brønd eller kørsel-til-kørsel. Disse resultater sammen med kontamineringsmålingerne i softwaren afhjælper risikoen for falske variationsresultater på grund af prøvekontaminering.

Evaluerings af sæt til nukleinsyreekstraktion

Tre kommercielt tilgængelige sæt til ekstraktion af DNA blev evalueret med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). De tre ekstraktionssæt anvendte forskellige afparaffineringsmidler og trin til nukleinsyrebinding ([Tabel 53](#)). Sæt 3 var det sæt, der oftest blev brugt til at fastslå ydeevnen for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Fem FFPE-prøver fra ovarier blev udsat for nukleinsyreekstraktion (tre sæt x to operatører x tre dage x to replikater) for at opnå DNA (36 observationer i alt). Kvalitativ analyse viste, at der ikke var nogen bemærkelsesværdig forskel i variationsbestemmelsen for nogen af variationstyperne (små BRCA DNA-variationer, BRCA LR'er, GIS), da alle variationsobservationer havde PPC-værdier > 97 %. Kvantitativ analyse viste ingen signifikant forskel forbundet med sæt til lille BRCA DNA-variant VAF og GIS.

Tabel 53 Sættets karakteristika

Sæt	Sætnavn	Afparaffinerings middel	Nukelinsyre binding
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE Væv	Xylen	Kolonne
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Mineralsk olie	Magnetiske perler
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Proprietær afparaffineringsopløsning	Kolonne

Reagensstabilitet

Realtidsstabilitet

Stabilitet i realtid blev evalueret ved hjælp af seks æggestokkræft FFPE-vævsprøver. Tre reagenslots blev testet på tværs af seks forskellige tidspunkter med ensartede intervaller (3 måneder, 6 måneder, 9 måneder, 13 måneder, 19 måneder og 25 måneder). To operatører udførte biblioteksklargøringerne for hver lot, herunder tre replikater af hver prøve, for i alt seks replikater pr. lot. For målrettede aggregerede små BRCA DNA-variationer var PPC 100 %, for målrettede BRCA LR-aggregat-PPC var det ≥ 92 %, og for GIS-aggregat-PPC var det ≥ 83 %. Derudover var der ingen signifikante forskelle forbundet med tid til GIS eller lille BRCA DNA-variation VAF.

Sættets stabilitet under brug

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysesættets stabilitet under brug blev evalueret under forhold med standardbrug gennem holdbarhedsperioden, for at understøtte anvendelsen af flere sæt. Reagenssættets frosne komponenter blev udsat for flere nedfrysninger/optøninger og nedkølede reagenser blev bragt op til stuetemperatur og testet for at understøtte op til fire anvendelser af sættet. Alle kriterier for kvalitetskontrol blev opfyldt for alle nedfrysnings-optøningscyklusser og testede tidspunkter. Variationsbestemmelse blev vurderet for små BRCA DNA-variationer, BRCA LR'er og GIS. Resultaterne understøtter op til fire nedfrysninger/optøninger af sættet. Derudover blev der brugt ét reagenssæt til at klargøre i alt 24 DNA-prøver af én operatør, hvilket viste, at der er tilstrækkelig reagensvolumen til 24 DNA- og 24 HRD-biblioteker.

Transportstabilitet

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens transportstabilitet for sættet blev evalueret ved hjælp af ni FFPE-prøver for æggestokkræft for at vise TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-reagenssættens funktionalitet efter eksponering for simulerede fordelingsforhold. Otte FFPE-prøver for æggestokkræft blev

brugt til at vise funktionalitet efter eksponering af reagenssættet for simulerede internationale sommer- og vintertemperaturprofiler. Funktionstestning blev udført efter eksponering ved hjælp af ovennævnte prøver, og bestod af seks til 12 replikater af hver prøve pr. tilstand. Sættets fysiske egenskaber blev også observeret, og det blev fundet til at blive opretholdt efter distribution for alle testtilfælde. Funktionel testning konkluderede, at forsendelse ikke påvirkede variationen i bestemmelsen af små BRCA DNA-varianter (PPC $\geq$ 96 %), BRCA LR (PPC $\geq$ 94 %) og GIS (PPC = 100 %) negativt i forhold til kontroltilstanden.

Prøvestabilitet

Nukleinsyrestabilitet

Stabiliteten af nukleinsyrer (DNA) og deres tilknyttede kvantificering til brug med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen blev evalueret ved hjælp af FFPE-prøver fra æggestokkræft. FFPE-blokke blev opdelt i sektioner, og DNA blev ekstraheret. Ekstraheret nukleinsyre blev grundigt blandet, kvantificeret og kontrolleret for nukleinsyre kvalitet og alikvoteret i to sæt engangsrør, der skal nedfryses på to tidspunkter: T0 (kontrol) og T1 (til at understøtte 28 dage). Alt ekstraheret DNA blev opbevaret ved -25 °C til -15 °C, indtil det blev testet ved T0 eller T1 med flere replikater og operatører. T1 blev sammenlignet med T0 for små BRCA DNA-varianter, BRCA LR'er og GIS. Dataene indikerer, at nukleinsyrer og deres tilhørende kvantificering til brug med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen er stabile i op til 28 dage, når de opbevares ved de anbefalede temperaturer (-25 °C til -15 °C).

Biblioteksstabilitet

Stabiliteten af biblioteker, der anvender hvert af de fem sikre stoptidspunkter for analysen (se [Tabel 54](#)), blev evalueret ved hjælp af flere FFPE-vævsprøver fra æggestokkræft og én FFPE-vævsprøve fra brystkræft. Kontrolbiblioteker (T0, ingen stoptidspunkter) blev sekvenseret med det samme ved slutningen af arbejdsgangen. Alikvoter fra de samme biblioteker blev afholdt ved stoptidspunkterne ved -25 °C til -15 °C i den tid (T1) til at understøtte de dage, der fremgår af [Tabel 54](#). T1 blev sammenlignet med T0 for små BRCA DNA-varianter, BRCA LR'er og GIS. Dataene angiver, at biblioteker genereret fra TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen er stabile i overensstemmelse med brugsanvisningen.

Tabel 54 Bibliotekets holdbarhed

Biblioteks- type	Plade	Antal dage
Fragmenteret gDNA	LP PCR	≤ 7
Inden berigelse	ALS PCR	≤ 30
Efter berigelse	ELU2 PCR	≤ 7
PCR efter berigelse	PL PCR	≤ 30
Normaliseret	NL PCR	≤ 32

Stabiliteten af FFPE-væv på objektglas

Stabiliteten af FFPE-væv på objektglas til brug sammen med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen blev evalueret ved at opdele FFPE-blokke (5 µm sektioner) fra ti FFPE-vævsprøver med æggestokkræft, overført til objektglas, og efterfølgende opbevare dem ved stuetemperatur (22 °C) på to tidspunkter: T0 (kontrol) og T1 (til at understøtte 28 dage). Nukleinsyremateriale blev kvantificeret og derefter behandlet med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen inden for 24 timer efter hvert tidspunkt. På hvert tidspunkt blev flere replikater pr. prøve testet af flere operatører. T1 blev sammenlignet med T0 for små BRCA DNA-varianter, BRCA LR'er og GIS. Variantionsbestemmelse blev vurderet. Dataene indikerer, at FFPE-væv monteret på objektglas til brug med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er stabilt ved stuetemperatur i op til 28 dage.

Brobygningforsøg for HRD klinisk ydeevne

For at validere TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen som CDx til udvælgelse af patienter med æggestokkræft til behandling med LYNPARZA (olaparib) blev residualprøver fra patienter, der var tilmeldt det kliniske PAOLA-1-forsøg (NCT02477644), testet til at understøtte et klinisk brobygningforsøg.

Forsøget blev udført for at vurdere konkordansen af HRD-status mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og den kliniske forsøgsanalyse (CTA), der blev anvendt i PAOLA-1, og for at vurdere den kliniske effekt af olaparib hos de HRD-positive patienter, der blev identificeret ved TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen. PAOLA-1 var et multicenter, fase III, randomiseret, dobbeltblindet, placebokontrolleret forsøg, der undersøgte den kliniske effekt af olaparib plus bevacizumab som førstelinje vedligeholdelsesbehandling for patienter med fremskreden æggestokkræft. Patienternes HRD-status blev bestemt efter randomisering før den primære analyse med CTA. Det primære endepunkt var progressionsfri overlevelse (PFS), defineret som tid fra randomisering til progression bestemt ved investigators vurdering ved hjælp af modificeret RECIST 1.1 eller død. Ud af de 806 patienter, der blev randomiseret i PAOLA-1-forsøget, var 399 resterende prøver tilgængelige til testning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Demografien for forsøgspersoner med tilgængelige TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater svarede til demografien i PAOLA-1-forsøget. Ligeledes var deltagerkarakteristika generelt ens mellem dem, der var HRD-positive med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) og dem, der var HRD-positive med CTA.

Konkordansresultater

Af de 399 prøver, der var tilgængelige til testning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), gav 382 et evaluerbart resultat. De 17 ikke-evaluerbare prøver gav ikke et resultat på grund af fejl i enten testkvalitetskontrol (N=12) eller patologisk gennemgang (N=5) (ugyldig analyserate på 3 % [12/394]). I alt 365 tilmeldte patienter havde prøver med både evaluerbare CTA- og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater. Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater i forhold til CTA-resultater blandt prøver med gyldige resultater er vist i [Tabel 55](#).

Tabel 55 Overensstemmelse mellem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) og CTA for påvisning af HRD

		CTA-resultat		
		HRD-positiv	HRD-negativ	I alt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseresultat	HRD-positiv	204	12	216
	HRD-negativ	5	144	149
	I alt	209	156	365
Statistisk overensstemmelse	PPA % (n/N; 95 % CI*)	97,6 % (204/209; 94,5 %, 99,2 %)		
	NPA % (n/N; 95 % CI*)	92,3 % (144/156; 86,9 %, 96,0 %)		
	OPA % (n/N; 95 % CI*)	95,3 % (348/365; 92,6 %, 97,3 %)		

* CI baseret på den nøjagtige binomiale metode (Clopper-Pearson, 1934).

Kliniske effektivitetsresultater

Den kliniske ydeevne af TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) blev fastlagt ved bestemmelse af klinisk effekt i den HRD-positive population. PFS-risikoforhold (HR) for olaparib- vs. placebo-behandlingsgrupperne blev beregnet med en ikke-justeret Cox model over proportionale farer. [Tabel 56](#) viser PFS-risikoforhold hos CTA- og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positive deltagere. [Figur 4](#) viser Kaplan-Meier-kurverne for PFS hos TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-positive deltagere. I CTA- og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positive populationer var PFS-risikoforholdet henholdsvis 0,33 (95 % CI: 0,25, 0,45) og 0,32 (95 % CI: 0,22, 0,48) og repræsenterede en reduktion på 67 % og 68 % i risikoen for progression eller død for deltagere i olaparib plus bevacizumab-gruppen sammenlignet med placebo plus bevacizumab-gruppen. En sensitivitetsanalyse, der tager hånd om effekten af tilskrevne manglende CDx-resultater, viste, at PFS-risikoforholdene i de tilskrevne HRD-positive populationer var i overensstemmelse med de primære analyseestimer.

Tabel 56 Klinisk effekt i CTA og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyse

		HRD-positiv	
		Olaparib +bev	Placebo +bev
CTA	N	225	132
	PFS ¹ (95 % CI) ²	37,2 (36,0, NR ⁴)	17,7 (15,8, 19,9)
	PFS HR (95 % CI) ³	0,33 (0,25, 0,45)	
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	N	149	71
	PFS ¹ (95 % CI) ²	NR ⁴ (37,2, NR ⁴)	17,4 (14,7, 22,1)
	PFS HR (95 % CI) ³	0,32 (0,22, 0,48)	

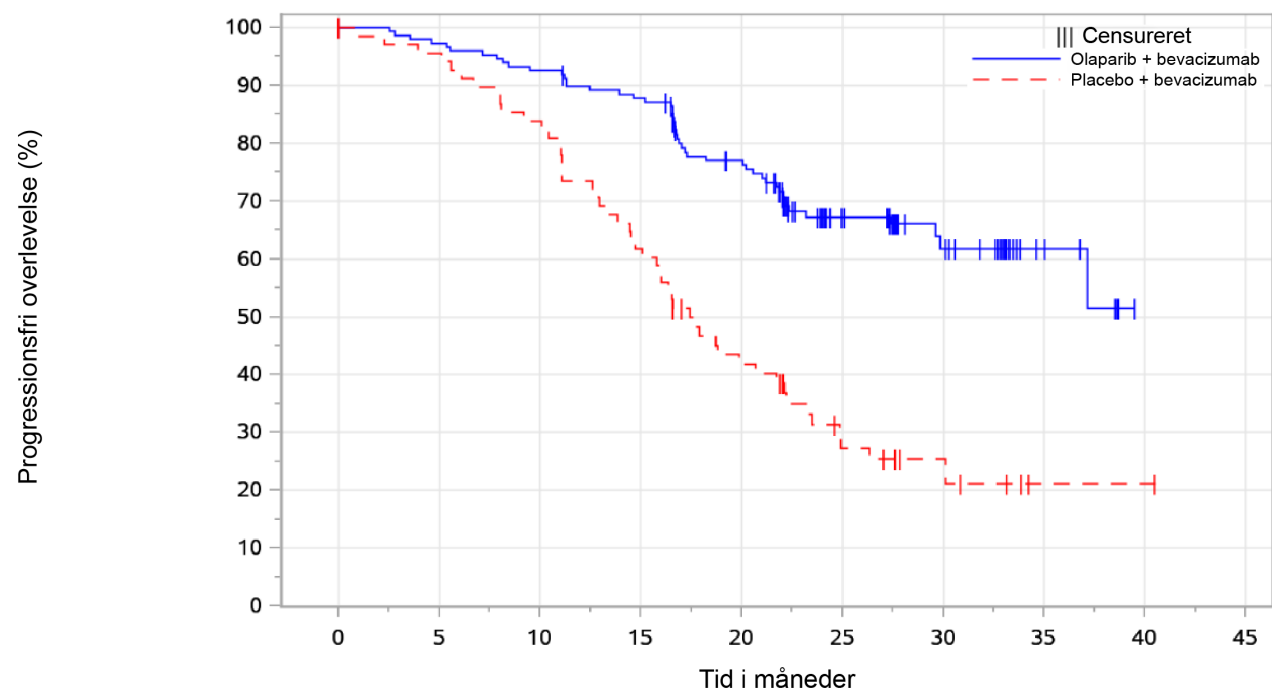
¹ PFS median i måneder.

² Fra produktgrænsemotoden (Kaplan-Meier) for censurerede data.

³ Baseret på en ikke-stratificeret Cox-regressionsmodel med behandling som kovarians.

⁴ NR = Ikke nået

Figur 4 Kaplan-Meier-kurve – PFS hos HRD-positive deltagere identificeret ved TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



I risiko

Olaparib + bevacizumab	149	144	137	129	101	60	29	8	0	0
Placebo + bevacizumab	71	65	57	42	26	14	6	1	1	0

Referencer

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33. doi:10.3322/caac.21654
2. Shih I-M, Wang Y, Wang T-L. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol.* 2021;191(1):26-39. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.006
3. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, et al. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. Stellungnahme der Organkommission Ovar der AGO: die neuen FIGO- und WHO-Klassifikationen des Ovarial-, Tuben- und primären Peritonealkarzinoms. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(10):1021-1027. doi: 10.1055/s-0035-1558079
4. Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nat.* 2011;474(7353):609-615. doi: 10.1038/nature10166
5. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(3):764-775. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2287
6. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10106):1949-1961. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32440-6
7. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2391-2402. doi: 10.1056/NEJMoa1910962
8. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1382-1392. doi: 10.1056/NEJMoa1105535
9. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(22):2154-2164. doi: 10.1056/NEJMoa1611310
10. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(26):2495-2505. doi: 10.1056/NEJMoa1810858
11. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1274-1284. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30469-2
12. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2416-2428. doi: 10.1056/NEJMoa1911361
13. Norquist BM, Brady MF, Harrell MI, et al. Mutations in Homologous Recombination Genes and Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients in GOG 218: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 2018;24(4):777. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1327
14. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012;307(4):382-390. doi: 10.1001/jama.2012.20

15. Moore KN, Secord AA, Geller MA, et al. Niraparib monotherapy for late-line treatment of ovarian cancer (QUADRA): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):636-648. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30029-4
16. Lynparza (Olaparib) Prescribing Information. *U.S. Food and Drug Administration* (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208558s013lbl.pdf). Published 2014. Updated Oct 2023. Accessed Mar 7 2025.
17. Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2014;5:3156-3156. doi: 10.1038/ncomms4156
18. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):75-87. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30559-9

Revideringshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200080934 v00	Maj 2026	Oprindelig udgivelse.

Patenter og varemærker

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

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

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

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF PRODUKTET/PRODUKTERNE, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2026 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

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

Kontaktoplysninger



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



Produktmærkning

Du kan finde en fyldestgørende forklaring på de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen på support.illumina.com under fanen *Documentation* (Dokumentation) for det relevante sæt.

Efter lanceringen af den europæiske database over medicinsk udstyr (Eudamed) er der en sammenfatning af sikkerhed og ydeevne (SSP) på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Den er tilknyttet det grundlæggende UDI-DI (0081627002TSOHRDDGRK).