

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

(EU) Packungsbeilage

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK-GEBRAUCH. NUR FÜR DEN EXPORT.

Beabsichtigter Verwendungszweck

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) ist ein qualitativer *In-vitro*-Diagnostiktest, der mithilfe von gezieltem Next-Generation-Sequencing homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) anhand von DNA beurteilt, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE)

Tumorgewebeproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom unter Verwendung des Illumina® NextSeq™ 550Dx Geräts extrahiert wurde. Mit diesem Test werden Einzelnukleotid-Varianten, Insertionen, Deletionen und große Rearrangements in den Genen BRCA1 und BRCA2 erkannt und ein Score für genomische Instabilität (Genomic Instability Score, GIS) ausgegeben.

Der Test soll als Begleitdiagnostikverfahren Krebspatienten identifizieren, die von einer Behandlung mit der in [Tabelle 1](#) aufgeführten gezielten Therapie möglicherweise profitieren, und entspricht der zugelassenen Kennzeichnung therapeutischer Produkte.

Tabelle 1 Begleitdiagnostische Indikation

Tumorart	Nachgewiesene(r) Biomarker	Therapy (Therapie)
Ovarialkarzinom, einschließlich epitheliales Ovarialkarzinom, Tubenkarzinom und primäres Peritonealkarzinom	Homologe Rekombinationsdefizienz (HRD) (definiert als deletäre oder vermutlich deletäre Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 und/oder als positiver Score für genomische Instabilität)	LYNPARZA® (Olaparib)

Zusammenfassung und Erläuterung von dem Assay

Klinische Beschreibung

Das Ovarialkarzinom hat unter den gynäkologischen Malignitäten die höchste Mortalitätsrate.¹ Das Ovarialkarzinom umfasst das epitheliale Ovarialkarzinom, das Tubenkarzinom und das primäre Peritonealkarzinom, die alle einen gemeinsamen biologischen Ursprung haben und für therapeutische Zwecke gemeinsam betrachtet werden.^{2,3} Ungefähr die Hälfte der Patientinnen mit hochgradigem serösem und endometrioidem Ovarialkarzinom, die geeignete histologische Unterkategorien sind, tragen genomische Defekte auf dem homologen Rekombinationsreparaturweg, die zu HRD führen.⁴ Das Vorhandensein von HRD ist mit einer Sensitivität gegenüber einer platinbasierten Chemotherapie⁵ und dem klinischen Ansprechen auf Poly (Adenosindiphosphat [ADP]-Ribose)-Polymerase(PARP)-Inhibitoren (PARPi), einer Klasse gezielter Therapien

bei Ovarialkarzinom, assoziiert,^{6–12} was zu einem verbesserten progressionsfreien und Gesamtüberleben führt.^{5,13,14} In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus bahnbrechenden klinischen Studien^{6,7,12,15} kann die Eignung für die PARPi-Behandlung bei einem Ovarialkarzinom auf dem HRD-positiven Status basieren.¹⁶ PAOLA-1 war eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase-III-Studie zur Untersuchung der klinischen Wirksamkeit von Olaparib plus Bevacizumab als Erstlinien-Erhaltungstherapie für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom.¹² Der TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN)-Assay wurde anhand von Proben von Patientinnen validiert, die in die klinische Studie PAOLA-1 aufgenommen wurden.

Unter den verschiedenen zugrunde liegenden Mechanismen, die den homologen Rekombinationsreparaturweg beeinträchtigen, sind Keimbahn- und/oder somatische Loss-of-Function-Mutationen in BRCA1- und BRCA2-Genen am besten charakterisiert.^{4,13,17} Tests zur Beurteilung der genomischen Instabilität (z. B. Substitutionen, Deletionen, Änderungen der Kopienzahl und strukturelle Rearrangements) untersuchen das Vorhandensein einer genomischen Narbe oder einer Mutationssignatur, die unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache auf das Vorhandensein einer HRD hindeutet. Der GIS ist eine Messung der genomischen Instabilität, die Informationen zu Large-Scale State Transitions (LST), Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) und allelischem Ungleichgewicht der Telomere (Telomeric-Allelic Imbalance, TAI) kombiniert. Die verfügbaren klinischen Studiendaten unterstützen die klinische Validität des GIS als Biomarker, der Patientinnen mit BRCA-Wildtyp-Ovarialkarzinom identifiziert, die einen signifikanten Nutzen aus der PARPi-Therapie ziehen.^{7,9,12,18}

Bei TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) handelt es sich um einen qualitativen Begleitdiagnostik(CDx)-Test mit Sequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation Sequencing, NGS), der den HRD-Status bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom durch den Nachweis kleiner DNA-Varianten und Deletionen auf Exonebene (als Large Rearrangements [LR] bezeichnet) in den Genen BRCA1 und BRCA2 ausgibt und gleichzeitig den GIS relativ zu einem Cut-off von 42 ermittelt.

Eine Liste der Regionen in den Genen BRCA1 und BRCA2, die vom Varianten-Calling ausgeschlossen sind, finden Sie in der *TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-Blockliste (Dokument-Nr. 200066147)* auf der Illumina [Support-Website](#).

Verfahrensprinzipien

Beim TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay handelt es sich um einen verteilten Test, der mit extrahierter Nukleinsäure als Zugabematerial manuell durchgeführt wird. Für die Bibliotheksvorbereitung wird aus FFPE-Gewebe extrahierte DNA verwendet. Die Bibliotheken werden anschließend für HRD-relevante Gene angereichert und mit dem NextSeq 550Dx-Gerät sequenziert.

Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay umfasst die folgenden Prozesse.

- **Bibliotheksvorbereitung und Anreicherung:** Aus FFPE-Gewebe werden 40 ng genomische DNA (gDNA) in kleine Fragmente geschert. An die gDNA-Fragmente werden Universaladapter für die Sequenzierung ligiert. In jede Bibliothek werden P5- und P7-Adaptersequenzen integriert, um während der Sequenzierung die Erfassung von Bibliotheksfragmenten an der Oberfläche der Fließzelle zu ermöglichen. Die Adapter enthalten eine i5- und i7-Indexsequenz zur Kennzeichnung der einzelnen Proben und einzelner Moleküle unter Verwendung von Unique Molecular Identifiers (UMIs). Die Bibliotheken werden für die spezifischen

Gene von Interesse mithilfe einer capture-basierten Methode angereichert. Biotinylierte Sondensequenzen, die von dem Assay anvisierte Genregionen von Interesse umfassen, werden in die Bibliotheken hybridisiert. Die Sonden und hybridisierten Zielbibliotheken werden von den nicht anvisierten Bibliotheken durch Capture mit magnetischen Streptavidin-Partikeln isoliert. Die angereicherten Zielbibliotheken werden gewaschen und amplifiziert. Die Menge der einzelnen angereicherten Bibliotheken wird anschließend mit einer bead-basierten Methode normalisiert, um eine ausgewogene Bibliotheksrepräsentation in den gepoolten Bibliotheken für die Sequenzierung zu gewährleisten.

- **Sequenzierung und Primäranalyse:** Normalisierte, angereicherte Bibliotheken werden durch Pooling und Clustering einer Fließzelle hinzugefügt. Anschließend werden sie im NextSeq 550Dx mittels sequencing by synthesis (SBS) sequenziert. Die SBS-Chemie erkennt mithilfe einer Methode mit reversiblen Terminatoren einzelne mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Deoxynucleotide Triphosphate (dNTP)-Basen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut werden. Während jedes Sequenzierungszyklus wird ein einzelnes dNTP in die Nukleinsäurekette eingebaut. Die dNTP-Markierung dient als Terminator für die Polymerisation. Nach jeder dNTP-Incorporation wird der Fluoreszenzfarbstoff zur Identifizierung der Base abgebildet. Anschließend wird die Markierung gespalten, um die Incorporation des nächsten Nukleotids zu ermöglichen. Es sind vier an reversible Terminatoren gebundene dNTPs (A, G, T und C) als einzelne, separate Moleküle vorhanden. So wird der Incorporation-Bias durch natürliche Mechanismen minimiert. Während der Primäranalyse erfolgen Base-Calls bei jedem Sequenzierungszyklus direkt anhand von Signalstärkemessungen, sodass eine Sequenzierung Base für Base erzielt wird. Jedem Base-Call wird ein Qualitäts-Score zugewiesen.
- **Sekundäranalyse:** Das TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemodul befindet sich auf dem DRAGEN-Server, das mit dem NextSeq 550Dx-Gerät gekoppelt ist, um die TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Lauf-Einrichtung zu erleichtern und die Sekundäranalyse der Sequenzierungsergebnisse durchzuführen. Das TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemodul führt eine Analyse durch, die die Validierung der Laufverarbeitung und die Qualitätskontrolle umfasst, gefolgt von Demultiplexing, der Erstellung von FASTQ-Dateien, Alignment und Variant-Calling. Durch Demultiplexing werden Daten aus gepoolten Bibliotheken anhand der eindeutigen Sequenzindizes, die während der Bibliotheksvorbereitung hinzugefügt wurden, getrennt. Die Software erstellt FASTQ-Zwischendateien, die die Sequenzierungs-Reads mit Qualitäts-Scores für jede Probe ohne Reads von Clustern, die den Filter nicht passiert haben, enthalten. Anschließend werden die Sequenzierungs-Reads mit einem Referenzgenom aligniert, um eine Beziehung zwischen den Sequenzen zu identifizieren. Anhand der Ähnlichkeitsregionen wird ein Score zugewiesen. Alignierte Reads werden in Dateien im BAM-Format gespeichert. Die Assay-Software verwendet separate Algorithmen für das Calling kleiner BRCA1- und BRCA2-DNA-Varianten, großer BRCA1- und BRCA2-Rearrangements und des GIS. Durch das Analysesoftwaremodul werden mehrere Ausgaben erstellt, einschließlich Sequenzierungsmetriken und Variant Call Format (VCF)-Dateien. VCF-Dateien enthalten Informationen über Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden. Für jede Probe werden Sequenzierungsmetriken und einzelne Ausgabedateien erstellt.
- **Tertiäranalyse:** Tertiäranalyse, durchgeführt von dem TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemodul besteht aus CDx-Calling und der Erstellung des Ergebnisberichts. Die interpretierten Variantenergebnisse

werden im TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Ergebnisbericht zusammengefasst. Siehe *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch (Dokument-Nr. 200080937)* für weitere Informationen zur Sekundär- und Tertiäranalyse.

Einschränkungen des Verfahrens

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.

- Nur zur Verwendung auf Verschreibung. Der Test muss von einer qualifizierten medizinischen Fachkraft unter Einhaltung der Vorschriften für klinische Labors angefordert werden.
- Entscheidungen über die Versorgung und Behandlung von Patienten müssen auf dem unabhängigen medizinischen Urteil des behandelnden Arztes beruhen, wobei alle relevanten Informationen über den Zustand des Patienten, z. B. die Patienten- und Familienanamnese, körperliche Untersuchungen, Informationen aus anderen diagnostischen Tests und die Präferenzen des Patienten, in Übereinstimmung mit dem Versorgungsstandard in einer bestimmten Gemeinschaft zu berücksichtigen sind.
- Die Qualität von FFPE-Proben ist stark unterschiedlich. Die Qualität kann wie folgt beeinträchtigt werden.
 - Bei Proben, die keinen standardmäßigen Fixierungsverfahren unterzogen wurden, lassen sich u. U. keine Nukleinsäuren extrahieren, die die Anforderungen der Qualitätskontrolle des Assays erfüllen ([Qualitätskontrolle auf Seite 69](#)).
 - Somatische Treibermutationen werden möglicherweise nicht zuverlässig nachgewiesen, wenn der Tumoranteil (nach Fläche) weniger als 20 % ist.
 - GIS ist möglicherweise nicht zuverlässig, wenn der Tumoranteil (nach Fläche) weniger als 33 % ist.
- Die Leistung von TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) in Proben von Patienten, bei denen eine Organ- oder Gewebetransplantation erfolgt ist, wurde nicht untersucht.
- Der Kontaminierungsnachweis kann wie folgt beeinträchtigt werden.
 - Bei stark rearrangierten Genomen mit Deletionen und Verlust der Heterozygotie stuft die TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Software DNA-Proben u. U. fälschlicherweise als kontaminiert ein (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - Eine Kontaminierung während des Verfahrens kann durch Nukleinsäure aus vorherigen Probenverarbeitungsschritten entstehen. Die gute Laborpraxis und die Einhaltung aller Vorsichtsmaßnahmen und Richtlinien in dieser Packungsbeilage tragen dazu bei, Kreuzkontaminationen zwischen Proben zu vermeiden.
- Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein einer Mutation unterhalb der Limits of Detection (LoD) des Assays nicht aus. Veränderungen bei Allelfrequenzen unterhalb der festgelegten LoD werden möglicherweise nicht konsistent erkannt.
- Die Sensitivität für den Nachweis kleiner DNA-Varianten kann durch folgende Faktoren beeinträchtigt werden:
 - Genomischer Kontext mit geringer Komplexität.
 - Erhöhung der Variantenlänge.

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) wurde für den Nachweis von BRCA-Insertionen und -Deletionen mit einer Länge von bis zu 19 bp und großen BRCA-Rearrangements auf Exonebene oder höher validiert. Varianten mit einer Länge von mehr als 19 bp sowie Veränderungen und Ereignisse unterhalb der Exonebene werden vom Assay möglicherweise nicht erkannt, können jedoch den HRD-Status beeinflussen. Entsprechende Korrelationen zwischen der klinischen Pathologie und den Laborwerten werden empfohlen.
- Deletionen auf Exonebene sind die einzigen großen Rearrangements, die von TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) gemeldet werden. Insertionen auf Exonebene werden vom Assay nicht gemeldet.

Produktkomponenten

Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Test umfasst folgende Komponenten:

- TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20140799) – Das Kit enthält Reagenzien mit ausreichendem Volumen für die Erstellung von 24 DNA-Bibliotheken. Dieses Volumen beinhaltet Patientenproben und Kontrollen. Das Kit enthält den Sondensatz, der zum Nachweis von BRCA-Mutationen verwendet wird. Kontrollen werden separat verkauft (siehe [Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien auf Seite 13](#)).



VORSICHT

RNA-Bibliotheksvorbereitungsreagenzien werden mit dem TSO Comprehensive (DRAGEN)-Kit bereitgestellt, sind jedoch nicht für den TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay erforderlich.

- TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)-Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20134650) – Das Kit enthält Reagenzien mit ausreichendem Volumen für die Erstellung von 24 DNA-Bibliotheksanreicherungen. Dieses Volumen beinhaltet Patientenproben und Kontrollen. Das Kit enthält den Sondensatz, der für die GIS-Bestimmung verwendet wird.
- Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul (Illumina, Katalog-Nr. 20132935), das folgende Komponenten enthält:
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Schadenspakete
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Software Suite
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-USB-Kit

Ein Illumina-Servicemitarbeiter installiert die jeweilige Version des TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemoduls und das Schadenspaket auf dem DRAGEN-Server für das NextSeq 550Dx-Gerät. Ausführliche Informationen zum Analysemodul finden Sie in *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch (Dokument-Nr. 200080937)*.

Reagenzien

Bereitgestellte Reagenzien

Illumina stellt bereit folgende Reagenzien.

TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-Kit (Illumina Katalog-Nr. 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), PN 20031118

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit T4 DNA Polymerase und Polynukleotidkinase	-25 °C bis -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Nukleotiden	-25 °C bis -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 °C bis -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Ligase	-25 °C bis -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit universellen Sequenzierungs-Oligonukleotiden	-25 °C bis -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit universellen Sequenzierungs-Oligonukleotiden	-25 °C bis -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 °C bis -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit DNA polymerase und Nukleotiden	-25 °C bis -15 °C

* Reagenz bereitgestellt, aber nicht erforderlich für TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), PN 20031119

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2° C bis 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Wässrige Lösung mit magnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA Lösung	2 °C bis 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primer, PN 20031120

Aktive Wirkstoffe: gepufferte wässrige Lösung mit durch individuelle Barcodes gekennzeichneten Oligonukleotid-Primern.



VORSICHT

Kombinieren Sie CPxx- und UPxx-Index-Primers nicht in derselben Bibliothek.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primer, PN 20031126

Aktive Wirkstoffe: gepufferte wässrige Lösung mit durch individuelle Barcodes gekennzeichneten Oligonukleotid-Primern.



VORSICHT

Kombinieren Sie CPxx- und UPxx-Index-Primers nicht in derselben Bibliothek.

Index-Primer	Artikel-nummer	Menge	Volumen	i7-Index	Sequenz	i5-Index	Sequenz	Lagerungstemperatur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C bis -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C bis -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C bis -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C bis -15 °C

Index-Primer	Artikel-nummer	Menge	Volumen	i7-Index	Sequenz	i5-Index	Sequenz	Lagerungstemperatur
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C bis -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C bis -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C bis -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C bis -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C bis -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C bis -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C bis -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C bis -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C bis -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C bis -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C bis -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C bis -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), PN 20031123

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Formamid und Salzen	2 °C bis 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und festen Phasen paramagnetischen Beads, kovalent beschichtet mit Streptavidin	2 °C bis 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxidlösung	2 °C bis 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festen Phase paramagnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNB1)	20031482	2	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol, und Formamid	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Wässrige Lösung mit magnetischen Beads	2 °C bis 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), PN 20031121

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Oligonukleotiden	-25 °C bis -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 °C bis -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel	-25 °C bis -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit DNA polymerase und Nukleotiden	-25 °C bis -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit P5 und P7 Primern	-25 °C bis -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	-25 °C bis -15 °C
PhiX (PX3 oder PhiX)	20031492	1	10 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit genomischer PhiX DNA	-25 °C bis -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Oligonukleotid-Sondenpool	-25 °C bis -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotid-Sondenpool	-25 °C bis -15 °C

* Reagenz bereitgestellt, aber nicht erforderlich für TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Die folgenden Reagenzien werden bereitgestellt, sind jedoch für TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) nicht erforderlich.

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Nukleotiden	-25 °C bis -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, DNA polymerase, RNase H und Nukleotiden	-25 °C bis -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Zufallshexameren	-25 °C bis -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit reverse transcriptase	-25 °C bis -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)-Kit (Illumina Katalog-Nr. 20134650)

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate), PN 20140116

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Formamid und Salzen	2 °C bis 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und festen Phasen paramagnetischen Beads, kovalent beschichtet mit Streptavidin	2 °C bis 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Natriumhydroxidlösung	2 °C bis 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festen Phase paramagnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNBW1)	20031482	1	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol, und Formamid	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Wässrige Lösung mit magnetischen Beads	2 °C bis 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze), PN 20140115

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Oligonukleotiden	-25 °C bis -15 °C

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	-25 °C bis -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel	-25 °C bis -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	1	550 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit DNA polymerase und Nukleotiden	-25 °C bis -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit P5 und P7 Primern	-25 °C bis -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	-25 °C bis -15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, PN 20140117

Reagenz	Artikel-nummer	Menge	Volumen	Aktive Wirkstoffe	Lagerungs-temperatur
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Oligonukleotid-Sondenpool	-25 °C bis -15 °C

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

Voramplifikationsreagenzien

- DNA Extraction and Purification Reagents: Die Anforderungen hinsichtlich der Reagenzien finden Sie unter [Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren auf Seite 21](#).
- DNA Quantification Reagents: Die Anforderungen hinsichtlich der Reagenzien finden Sie unter [Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren auf Seite 21](#).
- TruSight Oncology Controls:
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina, Katalog-Nr. 20090155)
- Ethanol (EtOH), 100 % (200 Proof), in Molekularbiologie-Qualität
- RNase/DNase-free water

Nachamplifikationsreagenzien

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina Katalog-Nr. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- EtOH, 100 % (200 Proof), in Molekularbiologie-Qualität
- RNase/DNase-free water

Lagerung und Handhabung von Reagenzien

Folgende Reagenzienkartons werden in gefrorenem Zustand geliefert. Lagern Sie diese bei -25 °C bis -15 °C.

Karton	Artikelnummer	Laborbereich
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Nachamplifikation
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Nachamplifikation
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze)	20140115	Nachamplifikation
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Nachamplifikation

Folgende Reagenzienkartons werden auf Gelkissen geliefert, um eine Temperatur zwischen 0 °C und 10 °C zu gewährleisten. Lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C.

Karton	Artikelnummer	Laborbereich
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Voramplifikation
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Nachamplifikation
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate)	20140116	Nachamplifikation



VORSICHT

Lagern Sie Reagenzien nicht in einem frostfreien Tiefkühlgerät oder in den Türfächern des Kühlschranks.



VORSICHT

Frieren Sie Reagenzien mit Beads (LNB1, SPB und SMB) nicht ein.

- Änderungen der physischen Struktur der Reagenzien können auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung).
- ERA1-B und TCB1 können produktbezogene Partikel enthalten. Beachten Sie die entsprechenden Richtlinien für die Handhabung der jeweiligen Reagenzien.
- Die Stabilität des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays wurde überprüft. Die Leistung wurde für bis zu vier Verwendungen des Kits nachgewiesen. Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie bei den auf der Verpackung angegebenen Temperaturen gelagert werden.

Equipment und Materialien

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Voramplifikations-Equipment und Materialien

Ausrüstung	Lieferant
Ultraschallgerät mit zugehörigem Zubehör Beziehen Sie sich auf Konfigurationseinstellungen für das Ultraschallgerät zur DNA-Fragmentierung auf Seite 18 .	Allgemeiner Lab-Lieferant
Vortexer	Allgemeiner Lab-Lieferant
Mikroproben Inkubatoren (2) mit Einsätzen für 96-Well MIDI Platten (2)	Allgemeiner Lab-Lieferant
Mikrozentrifuge	Allgemeiner Lab-Lieferant
Plattenzentrifuge mit folgenden Spezifikationen: • Kompatibel mit 96-Well Mikro Platten • Fähig zu 280 × g (+/- 10 %)	Allgemeiner Lab-Lieferant
Plattenschüttler mit folgenden Spezifikationen: • 2 mm Orbit • Kann bei 1200 rpm und 1800 rpm schütteln	Allgemeiner Lab-Lieferant
Sealing Keil oder Roller	Allgemeiner Lab-Lieferant
Magnet Stativ mit den folgenden Spezifikationen: • Designed für paramagnetisch Bead Präzipitation/Separation • Magnete auf der Seite von dem Stativ (nicht auf dem Boden) • Kompatibel mit 96-Well MIDI Platten	Allgemeiner Lab-Lieferant

Ausrüstung	Lieferant
Präzisionspipetten, geeignet für die präzise Abgabe von Volumina zwischen 2 µl bis 1000 µl mit den folgenden Spezifikationen: - Ein- oder Mehrkanalpipette mit Inkrement von 0,02 µl - Ein- oder Mehrkanalpipette mit Inkrement 0,1 µl, 0,2 µl oder 0,5 µl - Ein- oder Mehrkanalpipette mit Inkrement 1 µl oder 2 µl Pipetten müssen regelmäßig kalibriert werden und die Genauigkeit muss innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegen.	Allgemeiner Lab-Lieferant
Pipette-Aid	Allgemeiner Lab-Lieferant
Eis oder Kälteblock	Allgemeiner Lab-Lieferant
Serologische 10-ml-Pipetten	Allgemeiner Lab-Lieferant
Adhäsiv Seals für 96-well Platten mit den folgenden Spezifikationen: - Abziehbar - Geeignet für skirted oder semi-skirted PCR Platten - Starker Klebstoff, der wiederholten Temperaturänderungen zwischen -20 °C und 100 °C widersteht. - DNase/RNase-frei	Allgemeiner Lab-Lieferant
Mikrozentrifugenröhrchen mit Kapazität von 1,7 ml, nukleasefrei	Allgemeiner Lab-Lieferant
Nukleasefreie Reagenzienbehälter (Einwegwannen, 50 ml) (oder vergleichbar)	Allgemeiner Lab-Lieferant
Konische 15-ml-Röhrchen	Allgemeiner Lab-Lieferant
Konische 50-ml-Röhrchen	Allgemeiner Lab-Lieferant
Kompatibel Aerosol resistent Pipette Spitzen	Allgemeiner Lab-Lieferant
96-well Lagerung Platten, 0,8 ml (MIDI Platten)	Fisher Scientific, Part # AB-0859 oder vergleichbar
96-well PCR Platten, kompatibel mit Thermal Cycler, 0,2 ml (Polypropylen Wells)	Allgemeiner Lab-Lieferant

Post-Amp Equipment und Materialien

Ausrüstung	Lieferant
NextSeq 550Dx Instrument	Illumina, Katalog # 20005715
Plattenzentrifuge mit folgenden Spezifikationen: - Kompatibel mit 96-Well Mikro Platten - Fähig zu 280 × g (+/- 10 %)	Allgemeiner Lab-Lieferant

Ausrüstung	Lieferant
Thermal Cycler mit den folgenden Spezifikationen: • Beheizter Deckel (100°C) • Umfassen ein 4 °C bis 99 °C Temperatur Bereich • ±0,25 °C Temperatur Genauigkeit • Kompatibel mit 96 Well PCR Platten, 0,2 ml • Beziehen Sie sich auf Thermocycler-Temperaturanstiegsrate auf Seite 20	Allgemeiner Lab-Lieferant
Vortexer	Allgemeiner Lab-Lieferant
Mikroproben Inkubator mit Einsatz für 96 Well MIDI Platten	Allgemeiner Lab-Lieferant
Trockenhitzeblock mit den folgenden Spezifikationen: • 25 °C bis 99 °C Temperaturbereich • ±5 °C Temperaturgenauigkeit • Stellen Sie sicher, dass die Mikrozentrifugenröhrchen mit dem Hitzeblock kompatibel sind	Allgemeiner Lab-Lieferant
Plattenschüttler mit folgenden Spezifikationen: • 2 mm Orbit • Kann bei 1200 rpm und 1800 rpm schütteln	Allgemeiner Lab-Lieferant
Mikrozentrifuge	Allgemeiner Lab-Lieferant
Sealing Keil oder Roller	Allgemeiner Lab-Lieferant
Magnet Stativ mit den folgenden Spezifikationen: • Designed für paramagnetisch Bead Präzipitation/Separation • Magnete auf der Seite von dem Stativ (nicht auf dem Boden) • Kompatibel mit 96-Well MIDI Platten	Allgemeiner Lab-Lieferant
Präzisionspipetten, geeignet für die präzise Abgabe von Volumina zwischen 2 µl bis 1000 µl mit den folgenden Spezifikationen: • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Inkrement von 0,02 µl • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Inkrement 0,1 µl, 0,2 µl oder 0,5 µl • Ein- oder Mehrkanalpipette mit Inkrement 1 µl oder 2 µl Pipetten müssen regelmäßig kalibriert werden und die Genauigkeit muss innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegen.	Allgemeiner Lab-Lieferant
Pipette-Aid	Allgemeiner Lab-Lieferant
Serologische 10-ml-Pipetten	Allgemeiner Lab-Lieferant
Adhäsiv Seals für 96-well Platten mit den folgenden Spezifikationen: • Abziehbar • Geeignet für skirted oder semi-skirted PCR Platten • Starker Klebstoff, der wiederholten Temperaturänderungen zwischen -20 °C und 100 °C widersteht. • DNase/RNase-frei	Allgemeiner Lab-Lieferant

Ausrüstung	Lieferant
Mikrozentrifugenröhrchen mit Kapazität von 2 ml, nukleasefrei	Allgemeiner Lab-Lieferant
Mikrozentrifugenröhrchen mit Kapazität von 1,7 ml, nukleasefrei	Allgemeiner Lab-Lieferant
Nukleasefreie Reagenzienbehälter (Einwegwannen, 50 ml) (oder vergleichbar)	Allgemeiner Lab-Lieferant
Konische 15-ml-Röhrchen	Allgemeiner Lab-Lieferant
Konische 50-ml-Röhrchen	Allgemeiner Lab-Lieferant
Kompatibel Aerosol resistent Pipette Spitzen	Allgemeiner Lab-Lieferant
96-well Lagerung Platten, 0,8 ml (MIDI Platten)	Fisher Scientific, Part # AB-0859 oder vergleichbar
96-well PCR Platten, kompatibel mit Thermal Cycler, 0,2 ml (Polypropylen Wells)	Allgemeiner Lab-Lieferant
Eis oder Kälteblock	Allgemeiner Lab-Lieferant

Konfigurationseinstellungen für das Ultraschallgerät zur DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung bzw. Scherung von DNA beeinflusst die Assay-Leistung, da sie die Verteilung der Fragmentgröße bestimmt, die sich wiederum auf die Coverage der Sequenzierung auswirkt. Verschiedene Konfigurationen fokussierter Ultraschallbehandlung wurden evaluiert und für den TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay optimiert ([Tabelle 2](#)).

- Die Scherdauer wurde im Hinblick auf die Maximierung der in der [Qualitätskontrolle auf Seite 69](#) beschriebenen Metrik MEDIAN_EXON_COVERAGE angepasst. Die Scherdauer (siehe [Tabelle 2](#)) und die Ergebnisse für MEDIAN_INSERT_SIZE waren über die Konfigurationen hinweg unterschiedlich.
- Die Konfigurationen 1–4 und 6 wurden mit 8-Streifenröhrchen aus Glas getestet. Für Konfiguration 5 wurde ein einzelnes Glasröhrchen verwendet. Die Röhrchenvolumenkapazitäten sind in [Tabelle 2](#) abgebildet.
- Bei der Optimierung der Konfigurationen 3–6 (kleinere Wasserbadvolumina) wurde die Pulszentrifugation verwendet.
- Die Konfigurationen 3–5 wurden in Röhrchen mit kleinerem Volumen geschert. Die Röhrchenvolumenkapazitäten beeinflussen die Scherparameter.
- Konfiguration 4 (Linearschallkopf, mittleres Wasserbadvolumen, entgastes Wasser) erforderte eine lange Impulsverzögerungszeit (40 Sekunden), um eine ähnliche MEDIAN_EXON_COVERAGE wie in Konfiguration 1 und 2 bei der nominalen Zugabe von 40 ng zu erzielen.
- Optimale Einstellungen für Konfiguration 3 führten zu einer etwas größeren Größenverteilung der Fragmente im Vergleich zu den anderen Konfigurationen (MEDIAN_INSERT_SIZE war etwa 5–10 Basenpaare größer).
- Die Konfigurationen 3 und 5 verwendeten nicht entgastes Wasser, die kleinsten Wasserbadgrößen.

- Die Konfigurationen 3 und 5 erforderten eine erhöhte DNA-Zugabe (50 ng für Konfiguration 3, 60 ng für Konfiguration 5), um eine ähnliche MEDIAN_EXON_COVERAGE im Vergleich zu den anderen 4 Konfigurationen zu erzielen, die die nominale Zugabe von 40 ng verwendeten.
- Bei Konfigurationen 3 und 5 kommt es zu einer stärkeren Schädigung und/oder Denaturierung. Dadurch ist die effektive Masse der für die Bibliotheksvorbereitung verwendbaren dsDNA-Moleküle geringer.

Zentrifugieren Sie die Scherröhrchen während des Rückgewinnungsprozesses, um sicherzustellen, dass das vorgegebene Volumen zurückgewonnen wird, da jeder Materialverlust die Leistung beeinträchtigt.

Tabelle 2 Ausgewertete Konfigurationen fokussierter Ultraschallbehandlung

Parameter	Konfiguration					
	1	2	3	4	5	6
Schallkopf	Linie	Punkt	Punkt	Linie	Punkt	Linie
Wasserbadvolumen	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Entgastes Wasser	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja
Wasserkühler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Wasserbadtemperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Spitzenimpulsleistung (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% Tastverhältnis	30	10	30	25	20	25
Zyklen pro Burst	200	200	1.000	1.000	1.000	600 ⁵
Pulszentrifugation (Bursts von 10 Sekunden)	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Verzögerungszeit für Pulszentrifugation	N. z.	N. z.	10 s	40 s	10 s	10 s
Scherdauer	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Probenverarbeitung	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Chargengröße	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Probenvolumen im 8-Streifen-Glasröhrchen	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Einzelröhrchen (50 µl)	130 µl (oder 96 microTUBE-Platte)
Dithering	N. z.	N. z.	N. z.	3 mm Y bei 20 mm/s	N. z.	1,5 mm Y bei 10 mm/s
DNA-Zugabeequivalent (für mittlere Exon-Coverage)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Die Scherdauer von 200 Sekunden umfasst 20 Bursts von je 10 Sekunden.

² Die Scherdauer von 320 Sekunden umfasst 32 Bursts von je 10 Sekunden.

Thermocycler-Temperaturanstiegsrate

Es wird empfohlen, die Thermocycler-Temperaturanstiegsrate zu optimieren. Beispielsweise wurde ein getestetes Modell von einer Standard- (und einer maximalen) Temperaturanstiegsrate von 5 °C/s auf 3 °C/s angepasst, um vergleichbare Ergebnisse wie bei anderen Modellen mit niedrigeren Standard-Temperaturanstiegsraten zu erhalten.

Erfassen, Transportieren und Lagern von Proben

Befolgen Sie die Standardverfahren für das Erfassen, Transportieren, Lagern und Verarbeiten von Proben.

Probenanforderungen

FFPE-Gewebe

Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay erfordert 40 ng DNA, die aus FFPE-Proben aus Ovarial-, Tuben- oder primärem Peritonealgewebe extrahiert wurde. Das Gewebe sollte mit für Molekularanalysen geeignetem Formalin-Fixativ (zum Beispiel 10 % neutral gepuffertem Formalin) fixiert werden. Das Gewebe darf nicht entkalkt sein. Vor Beginn des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays muss die Gewebeprobe von einem Pathologen auf ihre Eignung für diesen Test untersucht werden. Zum Nachweis von somatischen Treibermutationen ist ein Tumoranteil von mindestens 20 % (Fläche) erforderlich. Zum Nachweis eines GIS ist ein Tumoranteil von mindestens 33 % (Fläche) erforderlich.

Für eine hohe Wahrscheinlichkeit der Extraktion von 40 ng DNA beträgt das empfohlene Gewebevolumen $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Dieses Volumen entspricht einer kumulativen lebensfähigen Gewebefläche von $\geq 200 \text{ mm}^2$ bei Verwendung von 5 μm dicken Schnitten oder $\geq 100 \text{ mm}^2$ bei Verwendung von 10 μm dicken Schnitten. Die kumulative Gewebefläche ergibt sich aus der Summe der verwendbaren Gewebeflächen in allen für die Extraktion eingereichten Abschnitten. Beispiel: Eine kumulative Gewebefläche von 200 mm^2 kann durch Extraktion von vier 5 μm dicken Abschnitten mit je 50 mm^2 Gewebefläche oder fünf 10 μm dicken Abschnitten mit je 20 mm^2 Gewebefläche erzielt werden. Durch Gewebnekrose kann die Menge an gewonnenen Nukleinsäuren verringert werden. Die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse lässt sich minimieren, indem das Gewebe makrosezirt wird, um nekrotisches Gewebe zu entfernen und den erwünschten verwendbaren Tumoranteil zu erzielen.

FFPE-Gewebe auf Trägern kann bis zu 28 Tage lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren

- Extrahieren Sie DNA aus FFPE-Gewebeproben mithilfe von im Handel erhältlichen Extraktionskits. Unterschiede bei den Extraktionskits können sich auf die Leistung auswirken. Beziehen Sie sich auf [Bewertung des Kits zur Extraktion der Nukleinsäuren auf Seite 89](#).
- Lagern Sie extrahierte Standard-Nukleinsäure gemäß den Anweisungen des Herstellers des Extraktionskits.
- Lagern Sie die extrahierte DNA bis zu 28 Tage bei $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Um Änderungen der Konzentration im Laufe der Zeit zu vermeiden, messen Sie DNA innerhalb von 28 Tagen nach Beginn der Library Prep. Quantifizieren Sie DNA mithilfe einer fluorometrischen Quantifizierungsmethode, die nukleinsäurebindende Farbstoffe verwendet. Nukleinsäure-Konzentration sollte der Mittelwert von mindestens drei Messungen sein.

- Der Assay erfordert 40 ng jeder gDNA Probe mit einer minimalen Extraktion Konzentration von 3,33 ng/µl. Scheren erfordert ein End Volumen von 52 µl (0,77 ng/µl), wobei mindestens 40 µl TEB (bereitgestellt) als Verdünnungsmittel verwendet werden.

Bibliothekslagerung

Lagern Sie Libraries in low bind PCR-Platten für 7 bis 32 Tage, abhängig vom Typ der Library (beziehen Sie sich auf [Tabelle 3](#)).

Tabelle 3 Aufbewahrungsdauer für Bibliotheken

Bibliothekstyp	Platte	Anzahl der Tage	Lagerungs-temperatur
Fragmentierte gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C bis -15 °C
Vor der Anreicherung	ALS PCR	≤ 30	-25 °C bis -15 °C
Nach der Anreicherung	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C bis -15 °C
PCR, nach der Anreicherung	PL PCR	≤ 30	-25 °C bis -15 °C
Normalisiert	NL PCR	≤ 32	-25 °C bis -15 °C

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit



WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gesundheitsschädliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Belüftung sollte für den Umgang mit gefährlichen Materialien in Reagenzien geeignet sein. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDB) unter support.illumina.com/sds.html.

- Einige Komponenten dieses Assays enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das karzinogen ist und in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine entsprechende Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden Sicherheitsstandards

Ihrer Region. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter support.illumina.com/sds.html, wenn Sie nach dem Produktcode suchen. (Weitere Informationen finden Sie unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 6.](#))

- Einige Komponenten dieses Assays enthalten das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich erfolgen und alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte sind gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region zu entsorgen. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter support.illumina.com/sds.html, wenn Sie nach dem Produktcode suchen. (Weitere Informationen finden Sie unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 6.](#))
- Einige Komponenten dieses Assays enthalten Natriumhydroxid, eine stark ätzende Base. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine entsprechende Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Handhaben Sie diese Komponenten gemäß den guten Laborpraktiken und entsorgen Sie sie gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter support.illumina.com/sds.html, wenn Sie nach dem Produktcode suchen. (Weitere Informationen finden Sie unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 6.](#))
- Einige Komponenten dieses Assays (EPM) enthalten Tetramethylammoniumchlorid, eine akut giftige und hautreizende Substanz, die für die Meeresumwelt gefährlich ist. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine entsprechende Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Handhaben Sie diese Komponenten gemäß den guten Laborpraktiken und entsorgen Sie sie gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter support.illumina.com/sds.html, wenn Sie nach dem Produktcode suchen. (Weitere Informationen finden Sie unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 6.](#))
- Behandeln Sie alle Proben, als wären sie erwiesenermaßen infektiös.
- Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Benutzen Sie zum Pipettieren nicht den Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien Einweghandschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Gerät unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedstaates, in dem sich Anwender und Patient befinden.

Labor

- Vermeiden Sie Kontaminationen, indem Sie im Labor einen unidirektionalen Workflow einhalten. Die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche müssen über eigene Geräte und Materialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexmischer und Zentrifuge) verfügen. Um eine Übertragung von

Amplifikationsprodukten oder Sonden zu vermeiden, kehren Sie nach Betreten des Nachamplifikationsbereichs nicht mehr in den Voramplifikationsbereich zurück.

- Führen Sie die Schritte zur Index PCR und Enrichment-Schritte in einem Nachamplifikationsbereich durch, um eine Übertragung von Amplifikationsprodukten zu vermeiden.
- Für die Bibliotheksvorbereitung ist eine RNase-/DNase-freie Umgebung erforderlich. Dekontaminieren Sie die Arbeitsbereiche sorgfältig mit RNase-/DNase-hemmendem Reinigungsmittel. Verwenden Sie Kunststoffe, die nachweislich frei von DNase, RNase und genomischer Human-DNA sind.
- Reinigen Sie für die Nachamplifikation die Arbeitsflächen und die Ausrüstung sorgfältig vor und nach jedem Verfahren mit einer frischen Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit (NaOCl). Lassen Sie die Lösung 10 Minuten lang auf den Oberflächen einwirken. Wischen Sie die Oberflächen anschließend mit 70%igem Ethyl- oder Isopropylalkohol ab.
- Verwenden Sie nukleasefreie Mikrozentrifugenröhrchen, Platten, Pipettenspitzen und Behälter.
- Verwenden Sie für den gesamten Assay kalibrierte Ausrüstung. Stellen Sie sicher, dass die Ausrüstung auf die in diesem Protokoll angegebenen Drehzahlen, Temperaturen und Volumina kalibriert wird.
- Verwenden Sie Präzisionspipetten, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Führen Sie die Kalibrierung regelmäßig gemäß den Herstellerspezifikationen durch.
- Beachten Sie bei Verwendung von Mehrkanalpipetten folgende Richtlinien:
 - Pipettieren Sie mindestens ein Volumen von $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Stellen Sie sicher, dass Spitzen mit Barriere genau passen und für die Marke und das Modell der Mehrkanalpipette geeignet sind.
 - Bringen Sie die Spitzen mit einer Drehbewegung an, damit alle Spitzen ordnungsgemäß sitzen.
 - Aspirieren Sie bei einem Winkel von 90° , achten Sie auf gleiche Flüssigkeitsvolumen in allen Spitzen.
 - Mischen Sie alle Komponenten nach der Lieferung, indem Sie das Reaktionsgemisch auf und ab pipettieren.
 - Stellen Sie nach der Abgabe sicher, dass die Flüssigkeit vollständig aus jeder Spitze abgegeben wurde.
- Verwenden Sie für den Assay spezifizierte Ausrüstung und konfigurieren Sie die Programme gemäß den Anweisungen.
- Die Temperaturangaben für den Thermocycler und den Mikroproben-Inkubator beziehen sich auf die Reaktionstemperatur; diese kann von der für die Ausrüstung festgelegten Temperatur abweichen.

Assay

- Vermeiden Sie Kreuz-Kontamination.
 - Folgen Sie korrekt Labor Praktiken wenn handhabend Proben und Reagenzien.
 - Verwenden Sie frisch konsumierbar Labware und frisch Pipette Spitzen zwischen Proben und zwischen dispensierend Reagenzien.
 - Verwenden Sie Aerosol resistent Spitzen zu reduzieren das Risiko von Kreuz-Kontamination.

- Nutzen Sie ein unidirektional Workflow wenn bewegend von Pre-amplification zu Post-amplification Bereichen.
- Handhaben und öffnen Sie jeweils immer nur einen Index-Primer. Schließen Sie jedes Index-Röhrchen unmittelbar nach der Verwendung. Extra Verschlüsse sind bereitgestellt in dem Kit.
- Wechseln Sie Ihre Handschuhe häufig bzw. nach jeder Berührung mit Index-Primern oder Proben.
- Entfernen Sie nicht verwendete Index-Primer-Röhrchen aus dem Arbeitsbereich.
- Geben Sie Reagenzien, die in Röhrchenstreifen, Wannen oder Behältern verwendet wurden, nicht zurück in die Aufbewahrungsröhrchen.
- Mischen Sie Proben mit einer Pipette und zentrifugieren Sie die Platte, wenn dies angegeben ist.
- Verwenden Sie einen Mikroplattenschüttler. Vortexen Sie nicht die Platten.
- Tauschen Sie Assay-Komponenten aus unterschiedlichen Reagenzien-Kit-Chargen nicht gegeneinander aus. Die Charge des jeweiligen Reagenzien-Kits ist auf dem Etikett des Reagenzien-Kits und auf dem Übersichtsblatt zur Charge angegeben.
- Ordnungsgemäße Laborpraktiken sind erforderlich, um eine Kontamination von Reagenzien, Instrumenten, Proben und Bibliotheken durch Nukleasen und PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontamination durch Nukleasen und PCR-Produkte kann zu ungenauen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- Nur mit dem entsprechenden Plattentyp können hinsichtlich Assay-Leistung und Lagerung optimale Ergebnisse erzielt werden. Befolgen Sie unbedingt die Anweisungen zur Plattenübertragung in [Gebrauchsanweisung auf Seite 34](#).
- Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer erheblichen Minderung der Bibliotheksqualität führen.
- Sofern in [Gebrauchsanweisung auf Seite 34](#) kein sicherer Haltepunkt angegeben ist, fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort.
- Lagern Sie die Assay-Reagenzien oder Komponenten bei der angegebenen Temperatur in ausgewiesenen Bereichen für Pre-amplifikation und Post-amplifikation.
- Lagern Sie Reagenzien nicht in einem frostfreien Tiefkühlgerät oder in den Türfächern des Kühlschranks.
- Frieren Sie Reagenzien mit Beads (LNB1, SPB und SMB) nicht ein.
- Verwenden Sie keine Reagenzien, die unsachgemäß gelagert wurden.
- Weichen Sie nicht von den für jedes Reagenz angegebenen Misch- und Handhabungsverfahren ab. Unzureichendes Mischen oder zu starkes Vortexen der Reagenzien kann zu fehlerhaften Probenergebnissen führen.
- ERA1-B und TCB1 können produktbedingte Partikel enthalten. Beachten Sie die Richtlinien für die Handhabung der jeweiligen Reagenzien.
- Bereiten Sie frische Master Mixe vor und entsorgen Sie das verbleibende Volumen nach der Verwendung.
- Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol mit RNase/DNase-free water für die Waschschritte vor. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse beeinflussen kann. Entsorgen Sie 80%iges Ethanol nach Gebrauch gemäß den örtlichen, staatlichen und/oder bundesweiten Vorschriften.

- Übertragen Sie das angegebene Eluatvolumen. Wenn während der Elutionsschritte weniger als das angegebene Eluatvolumen übertragen wird, kann dies die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Beachten Sie die folgenden Richtlinien für Ultraschallgeräte (Sonicators). Befolgen Sie unbedingt die Anweisungen des Herstellers.
 - Geben Sie die gDNA langsam in das Ultraschallröhrchen, um Blasenbildung zu vermeiden. Übermäßige Blasenbildung oder Lufteinschlüsse im Scherröhrchen können zu einer unvollständigen Fragmentierung führen.
 - Befüllen Sie die Ultraschallröhrchen langsam und vermeiden Sie Spritzer.
 - Um Flüssigkeitsverdrängung und Probenverlust zu vermeiden, führen Sie die Pipettenspitze beim Entnehmen fragmentierter DNA nicht bis zum Boden des Ultraschallröhrchens ein.
- Pipettieren Sie nicht weniger als 2 µl der Probe.
- Verwenden Sie keine Schale zur Abgabe von Reagenzien für Schritte, bei denen weniger als 10 µl Material in die einzelnen Proben-Wells gegeben werden müssen.
- Verwenden Sie eine Pipette mit feiner Spitze beim Übertragen der fragmentierten gDNA-Proben von den Ultraschallröhrchen auf die Library Prep (LP)-Platte.
- Verwenden Sie ausschließlich UMI-Adapter.
- Verwenden Sie keine SUA1-Adapter.
- Weisen Sie jeder Bibliotheksprobe spezifische Index-Primer zu, um jede Bibliothek beim Pooling für die Sequenzierung auf einer einzelnen Fließzelle identifizieren zu können.
- Es können UPxx-Indizes oder CPxx-Indizes verwendet werden.
- Kombinieren Sie CPxx- und UPxx-Index-Primer nicht in derselben Bibliothek.
- Fehlpaarungen zwischen Proben und Index-Primern führen aufgrund von Identifikationsverlust zu fehlerhaften Ergebnisberichten. Geben Sie die Proben-IDs ein und weisen Sie die Indizes in Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) Analyse Modul zu, bevor Sie mit der Library Preparation beginnen. Notieren Sie Proben-IDs, Indexierung und die Ausrichtung der Platten-Wells zur Referenz während der Library Preparation.
- Sequenzieren Sie pro Fließzelle maximal 16 DNA-Bibliotheken. Sequenzieren Sie mindestens sechs Bibliotheken. Befolgen Sie die Richtlinien in [Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes auf Seite 31](#).
- Fahren Sie nach dem Bindungsschritt in [Capture-Ziele, Eins auf Seite 50](#) und [Capture-Ziele, Zwei auf Seite 54](#) sofort mit dem Waschschrift fort, um ein Austrocknen der Bead-Pellets zu vermeiden.
- Entfernen Sie während der Waschschrift das gesamte 80%ige Ethanol vom Boden der Wells. Ethanolrückstände können die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Befolgen Sie für eine optimale Assay-Leistung die in [Gebrauchsanweisung auf Seite 34](#) angegebene Anzahl an Waschvorgängen.
- Resuspendieren Sie das library bead Pellet während des Verfahrens [Normalisieren Sie Libraries auf Seite 60](#) gründlich, um eine einheitliche Clusterdichte auf der Fließzelle zu erzielen.

- DNA-Bibliotheken aus derselben Probe werden mit zwei verschiedenen Sondensätzen angereichert, verwenden jedoch denselben Index und müssen auf derselben Fließzelle sequenziert werden.
- Verarbeiten Sie Positivkontrollen und die No-Template-Kontrolle (NTC) wie eine Probe und teilen Sie sie zum Enrichment mit beiden Sondensätzen auf.

Verfahrenshinweise

- Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Workflow kann gemäß dem folgenden Zeitplan durchgeführt werden:
 - Tag 1: DNA Fragmentation von gDNA Proben, Library Preparation, und beginnen Overnight (First) Hybridisierung.
 - Tag 2: Anreicherung, Normalisierung von angereicherten Bibliotheken, und Laden von Bibliotheken auf das NextSeq 550Dx-Gerät.

Für den Fall, dass der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Workflow nicht gemäß diesem Zeitplan durchgeführt werden kann, sind im Protokoll mehrere sichere Haltepunkte angegeben. Fahren Sie umgehend mit dem nächsten Schritt fort, außer wenn im Protokoll ein sicherer Haltepunkt angegeben ist.

- Bibliotheken abgeleitet von DNA sind in separate Wells für simultane Anreicherung mit dem OPD2 Sonden Set und dem OPD3 Sonden Set aufgeteilt. Positiv Kontrollen und NTCs müssen folgen dem gleichen Verfahren.
- Verwenden Sie die TruSight Oncology Comp Enrichment Komponenten (PN 20031123, PN 20031121) mit OPD2 von dem TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122). Bibliotheken enriched mit OPD2 sind bezeichnet als DNA Bibliotheken.
- Verwenden Sie die TruSight Oncology Comp HRD Enrichment Komponenten (PN 20140116, PN 20140115) mit OPD3 von dem TruSight Oncology Comp HRD Content Set (PN 20140117). Bibliotheken enriched mit OPD3 sind bezeichnet als DNA HRD Bibliotheken.
- In den Tabellen für die Vorbereitung der Master-Mischung sind Volumenüberschüsse angegeben, um sicherzustellen, dass ausreichend Volumen für die Anzahl zu verarbeitender Proben bereitsteht.
- Verwenden Sie Reinstwasser, das frei von Nukleasen ist.
- Spülen Sie nach Zugabe der Reagenzien die Spitze, indem Sie die Reagenzien im entsprechenden Well der Platte einmal aspirieren und wieder abgeben, sofern nicht anders im Verfahren angegeben.
- Raumtemperatur ist definiert als 15 °C bis 30 °C.
- Reagenzien, Proben und Bibliotheken müssen bei bestimmten Schritten der Gebrauchsanweisung gekühlt gelagert werden. Dies ist definiert als Aufbewahrung auf Eis oder gleichwertiger Aufbewahrung.

Programme des Thermocyclers

- Konfigurieren Sie vor Beginn des Protokolls die Programme des Thermocyclers an Geräten für die Nachamplifikation.

- Stellen Sie sicher, dass die PCR-Platten fest im Thermocycler sitzen.
- Verwenden Sie vom Hersteller des Thermocyclers empfohlene Platten.

Versiegeln und Entsiegeln die Platte

- Versiegeln Sie die Platten immer mit einer neuen selbsthaftenden Verschlussfolie. Versiegelungen dürfen nicht mehrfach verwendet werden.
- Versiegeln Sie die Platte, in dem Sie die selbsthaftende Verschlussfolie mit einem Dichtkeil oder einer Siegelwalze auf der Platte anbringen.
- Versiegeln Sie die 96-Well-Platte stets vor den folgenden Schritten im Protokoll mit einer neuen selbsthaftenden Verschlussfolie.
 - Schritte zum Schütteln der Platte
 - Schritte zum Zentrifugieren
 - Thermocycler-Schritte
 - Hybridisierungen
 - Lagerung über einen längeren Zeitraum
- Stellen Sie sicher, dass die Ränder und Wells versiegelt sind, um das Risiko für Kreuzkontaminierung und Verdunstung zu verringern.
- Legen Sie die Platte auf eine ebene Oberfläche, bevor Sie die Versiegelung langsam entfernen.
- Wenn an der Versiegelung oder den Seitenwänden der Platten-Wells Flüssigkeit oder Kondensation sichtbar ist, zentrifugieren Sie die Platte vor Entfernen der Versiegelung 1 Minute lang bei 280 × g.
- Verwenden Sie selbsthaftende Verschlussfolie, die für Temperaturen zwischen -20 °C und 100 °C sowie für PCR-Platten mit Rahmen oder Halbrahmen geeignet ist.

Equipment

- Stellen Sie vor Beginn des Assays sicher, dass die Labormitarbeiter mit den Herstelleranweisungen für Betrieb und Wartung sämtlicher Ausrüstung vertraut sind.

Plattentyp und Plattenübertragungen

- Nur mit dem entsprechenden Plattentyp können hinsichtlich Assay-Leistung und Lagerung optimale Ergebnisse erzielt werden.
- Wenn Sie Volumen zwischen den Platten übertragen, müssen die angegebenen Volumen aus jedem Well einer Platte in den entsprechenden Well der Zielpatte übertragen werden.
- Für das Übertragen von Proben zwischen Röhrchenstreifen oder Platten können Mehrkanalpipetten verwendet werden.
- Befolgen Sie beim Schütteln der Platten folgende Richtlinien.
 - Schütteln Sie Platten mit einem Plattenschüttler. Mischen Sie Platten nicht mit dem Vortexmischer.

- Schütteln Sie PCR Platten bei 1200 rpm.
- Schütteln Sie MIDI Platten bei 1800 rpm.
- Befolgen Sie die Herstelleranweisungen, um sicherzustellen, dass die Platte sicher im Plattenschüttler sitzt.

Zentrifugieren

- Wenn laut Protokoll ein kurzes Zentrifugieren erforderlich ist, zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 280 x g.
- Wenn an der Versiegelung oder den Seiten eines Wells Flüssigkeit sichtbar ist, zentrifugieren Sie die Platte 1 Minute lang bei 280 x g.

Handhabung von Reagenzien

- Verschließen Sie sorgfältig alle Reagenzienröhrchen unmittelbar nach Verwendung, um die Verdunstung zu minimieren und eine Kontaminierung zu verhindern.
- Lagern Sie die Reagenzien, die Sie für das Verfahren nicht mehr benötigen, wieder bei der angegebenen Aufbewahrungstemperatur.
- Befolgen Sie die Anweisungen für die Vorbereitung der Reagenzien, die vor der Verfahrensbeschreibung in der [Gebrauchsanweisung auf Seite 34](#) angegeben sind.
- Stellen Sie sicher, dass Sie die für die Anzahl der zu verarbeitenden Proben erforderlichen Volumen der Master-Mischung, der Elutionsmischung und von 80%igem Ethanol bereitstellen.
- In den Tabellen für Master-Mischung und Lösungen sind die Volumen mit Überschüssen angegeben. Die Überschüsse werden wie folgt berechnet.
 - [Tabelle 13](#)
 - Volumen von ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,20)$.
 - Volumen von ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,20)$.
 - [Tabelle 23](#)
 - Volumen von EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,364)$.
 - Volumen von HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,364)$.
 - [Tabelle 24](#)
 - Volumen von EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,364)$.
 - Volumen von HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,364)$.
 - [Tabelle 30](#)
 - Volumen von LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (2,0)$.
 - Volumen von LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (2,0)$.

- [Tabelle 31](#)
 - Volumen von EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,25)$.
 - Volumen von HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{Anzahl von Bibliotheken}) \times (1,25)$.

Adapter Sätze

- Verwenden Sie ausschließlich UMI Adapter.
- SUA1 Adapter werden bereitgestellt, sind jedoch für den TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay nicht erforderlich.

Handhabung Beads

- Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Assay umfasst drei Bead Typen (SPB, SMB, und LNB1). Stellen Sie sicher, dass für das Verfahren der richtige Bead Typ verwendet wird.
- Führen Sie für jeden Bead Typ die korrekte Anzahl an Waschläufen durch.
- Stellen Sie sicher, dass die Beads bei Raum Temperatur vor Gebrauch sind.
- Mischen Sie die Beads vor der Verwendung 1 Minute lang, um Homogenität zu gewährleisten.
- Beachten Sie beim Mischen von Beads mit einer Pipette die folgenden Richtlinien:
 - Verwenden Sie eine geeignete Pipette und Spitze Größe für das Volumen das Sie mischen.
 - Stellen Sie das Pipette Volumen auf rund 50-75 % des Probe Volumens ein.
 - Pipettieren Sie langsam, lassen Sie den Kolben nicht los.
 - Vermeiden Sie Spritzen und Blasen.
 - Positionieren Sie die Pipette Spitze über dem Pellet und pipettieren Sie direkt in das Pellet, um Beads vom Well oder Röhrchen zu lösen.
 - Stellen Sie sicher, dass das Bead Pellet vollständig in der Lösung ist. Die Lösung sollte dunkel braun aussehen und eine homogene Konsistenz haben.
 - Überprüfen Sie, ob ein Bead Pellet vorhanden ist. Aspirieren Sie vorsichtig die gesamte Bead Lösung von Well in die Spitze und sehen Sie auf den Boden von Wells.
- Wenn Beads in die Pipette Spitzen während magnetisch Trennung Schritten aspiriert werden, geben Sie die Beads zurück zu dem Platte Well auf dem Magnet Stativ. Warten Sie bis die Flüssigkeit klar ist (ungefähr 2 Minuten) bevor Sie zum nächsten Schritt des Verfahrens fortfahren.
- Beim Waschen von Beads:
 - Verwenden Sie für die Platte das empfohlene Magnet Stativ.
 - Geben Sie Flüssigkeit direkt auf das Bead Pellet so dass Beads auf der Seite von den Wells befeuchtet sind.
 - Behalten Sie die Platte auf dem Magnet Stativ bis das Verfahren spezifiziert zu entfernen sie.
 - Nicht agitieren die Platte während auf dem Magnet Stativ.
 - Während auf dem Magnet Stativ, nicht stören das Bead Pellet.

- Beim Waschen von Beads oder entfernen Überstand, winkeln Sie Pipette Spitzen an dem Boden von den Wells zu vermeiden kreieren ein Vakuum und ziehen Lösung in die Pipette Spitze Filter.

Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes

Legen Sie vor der Laufkonfiguration die Anzahl der Probenbibliotheken und Probenindizes für den Sequenzierungslauf fest. Die folgenden Richtlinien für die Probenanzahl beinhalten positive Kontrollproben, jedoch keine NTCs. NTCs müssen dem geplanten Lauf als zusätzliche Probe hinzugefügt werden.

Index-Primer ermöglichen das eindeutige Identifizieren jeder Probe. Bibliotheken können so für die Sequenzierung auf einer Fließzelle gepoolt werden. Die Indizes werden während der Laufkonfiguration im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) im Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) Analyse Modul angezeigt. Fügen Sie während der Bibliotheksvorbereitung jeder Probenbibliothek den Index-Primer hinzu. **Verwenden Sie für jede Probenbibliothek eine andere Index-Primer-Mischung.**

Indexierte Bibliotheken aus der selben Probe werden in zwei Anreicherungen mit zwei verschiedenen Sonden Sätzen aufgeteilt. Die beiden daraus resultierenden angereicherten Bibliotheken haben denselben Index und müssen auf derselben Fließzelle sequenziert werden.

Mindest- und Höchstzahl an Bibliotheken, die bei der Sequenzierung auf einer Fließzelle sequenziert werden sollen, finden Sie unter [Tabelle 4](#).

Tabelle 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Sequenzierung

Bibliothekstyp	Anreicherung	Mindestens*	Höchstens*
DNA	OPD2	3	8
DNA HRD	OPD3	3	8

* NTCs tragen nicht zur Plexität bei.

Für eine optimale Nutzung der Reagenzien bei der Sequenzierung auf dem NextSeq 550Dx-Gerät sequenzieren Sie 8 DNA-Bibliotheken (OPD2) und 8 DNA-HRD-Bibliotheken (OPD3) pro Fließzelle.

Stellen Sie sicher, dass die von Ihnen mit Proben verwendeten Index-Primer den von Ihnen in Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) Analyse Modul zur Analyse ausgewählten Indizes entsprechen. **Abweichungen führen aufgrund der fehlenden positiven Probenidentifizierung zu falschen Ergebnisberichten.**

Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -Assay umfasst zwei Indextypen (UPxx und CPxx).

Wird die Mindestanzahl an Bibliotheken (3 DNA-Bibliotheken und 3 DNA-HRD-Bibliotheken) sequenziert, beachten Sie Folgendes:

- Verwenden Sie keine CPxx-Indexsätze.
- Durch einen der folgenden UPxx-Indexsätze muss eine ausreichende Vielfalt gewährleistet werden:
 - UP01, UP02 und UP03
 - UP04, UP05 und UP06

- UP07, UP08 und UP09
- UP10, UP11 und UP12

Beispiel, der ersten Bibliothek wird UP01, der zweiten Bibliothek UP02 und der dritten Bibliothek UP03 zugewiesen.

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) erfordert die TruSight Oncology DNA Control v2 als Positivkontrolle. Geben Sie die TruSight Oncology DNA Control v2 für alle DNA-Sequenzierungsläufe innerhalb einer bestimmten Bibliotheksvorbereitung hinzu. Für jeden geplanten Sequenzierungslauf wird eine eindeutige positive Kontrollprobe vorbereitet. Weitere Informationen finden Sie unter TruSight Oncology DNA Control v2 (EU) Packungsbeilage.

Die Eingangsmenge der TruSight Oncology DNA Control v2 beträgt 2 µl.

Fügen Sie bei jeder Bibliotheksvorbereitung die NTC hinzu. Die NTC wird innerhalb einer Bibliotheksvorbereitung wiederholt sequenziert. Befolgen Sie diese Anweisungen für die Positivkontrolle und die NTC:

- Bereiten Sie Bibliotheken aus positiven Kontrollproben und NTCs auf die gleiche Weise wie Proben vor. Die Positivkontrolle und die NTC müssen zur Enrichment mit beiden SONDENSÄTZEN auf die gleiche Weise wie Proben aufgeteilt werden.
- Verwenden Sie TEB für die DNA NTC.
- Die positiven Kontrollproben sind in den Maximalanforderungen für Bibliotheken enthalten.
- Die NTCs sind nicht in den Mindestanforderungen für Bibliotheken enthalten.
- Verwenden Sie bei der Sequenzierung der Mindestanzahl an Bibliotheken UP-Indizes für die NTC.
- Da die NTC wiederholt sequenziert wird, kann der für diese Kontrollprobe ausgewählte Index für die Bibliotheksvorbereitung nicht erneut verwendet werden.

In den folgenden Tabellen sind Beispiele für Plattenlayouts für den Workflow bei der Bibliotheksvorbereitung aufgeführt ([Abbildung 1](#)). In jeder nummerierten Spalte ist ein einzelner Sequenzierungslauf dargestellt. Die NTC wird für jede Spalte bzw. jeden Spaltensatz sequenziert.

Tabelle 5 Bibliotheksvorbereitungsplatte für einen Einzellauf mit sechs Patientenproben

	1	2	3	4	5	6
A	Pos. DNA-Kontrolle	leer	leer	leer	leer	leer
B	DNA 1	leer	leer	leer	leer	leer
C	DNA 2	leer	leer	leer	leer	leer
D	DNA 3	leer	leer	leer	leer	leer
E	DNA 4	leer	leer	leer	leer	leer
F	DNA 5	leer	leer	leer	leer	leer
G	DNA 6	leer	leer	leer	leer	leer
H	DNA NTC	leer	leer	leer	leer	leer

Tabelle 6 Bibliotheksvorbereitungsplatte mit drei Läufen mit 20 Patientenproben

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

Gebrauchsanweisung

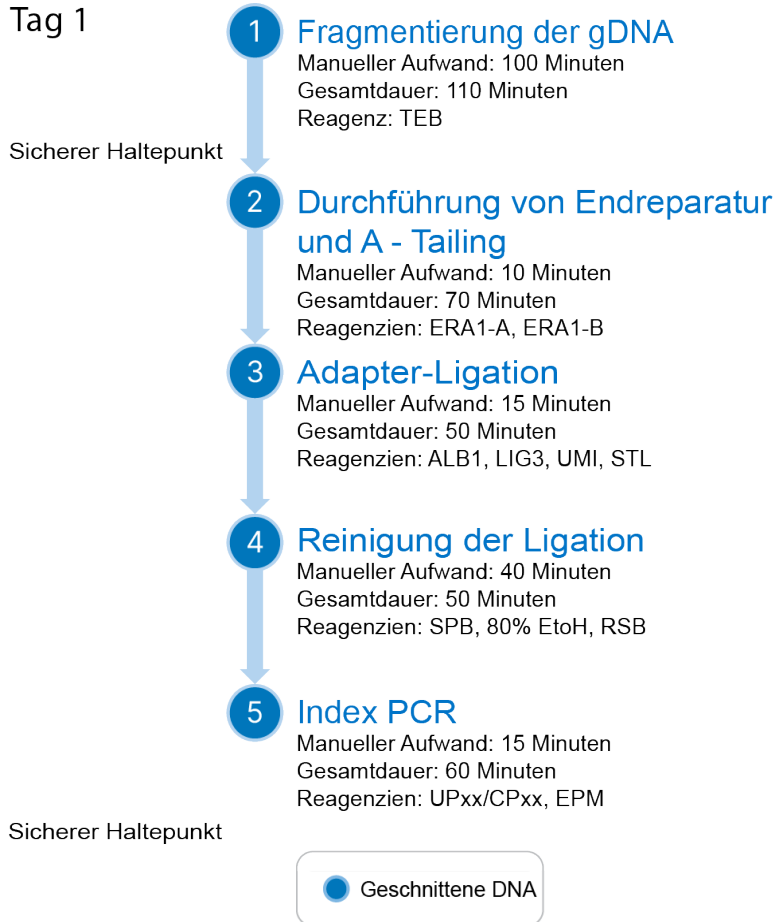
Ein Überblick von dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Workflow ist gezeigt in [Abbildung 1](#) und [Abbildung 2](#).

Bibliotheksvorbereitungs-Workflow

In [Abbildung 1](#) ist der Bibliotheksvorbereitungs-Workflow für TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) dargestellt. Positive Kontrollproben und NTC werden auf die gleiche Weise wie Proben verarbeitet. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Geben Sie vor dem Starten des Protokolls die Lauf- und Probeninformationen in das Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) Analyse Modul ein. Weitere Informationen finden Sie im *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch (Dokument-Nr. 200080937)*.

Abbildung 1 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Workflow (Teil 1)

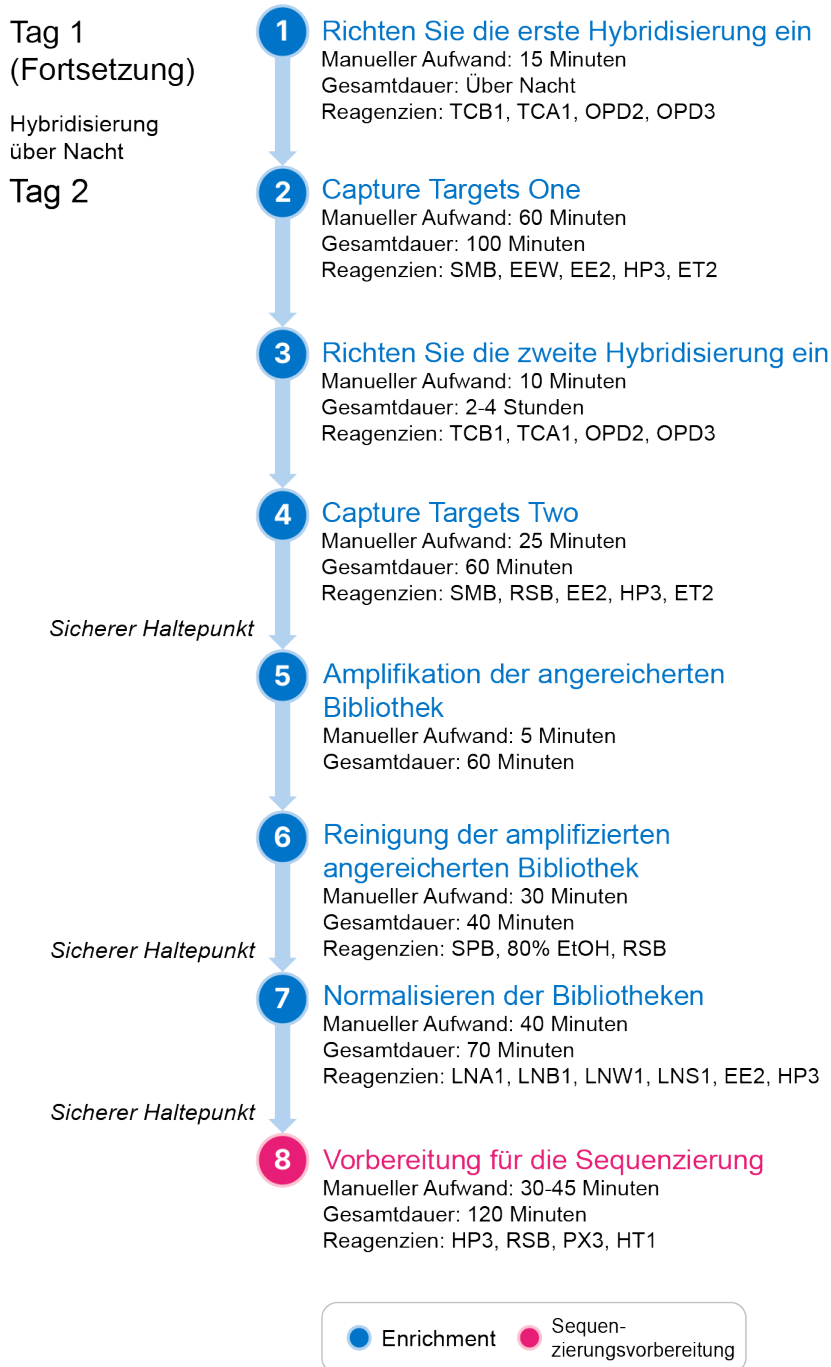


* Die Angaben zu manuellem Aufwand und Gesamtdauer sind Schätzwerte.

Anreicherung Workflow

Abbildung 2 illustriert den Anreicherung Workflow. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Abbildung 2 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Workflow (Teil 2)



Programmieren Sie Thermal Cyclers

Vor dem Starten von Assay, speichern Sie die folgenden Programme auf Post-amplification Thermal Cyclers.

Tabelle 7 Post-amplification Thermal Cycler Programme

Verfahren Schritt	Programm Name	Deckel Temperatur	Reaktion Volumen	Thermal Cycler Parameter
Index PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C für 30 Sekunden • 15 Zyklen von: • 98 °C für 10 Sekunden • 60 °C für 30 Sekunden • 72 °C für 30 Sekunden • 72 °C für 5 Minuten • Halten Sie bei 10 °C
Perform erste Hybridisierung	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C für 10 Minuten • 85 °C für 2 min 30 Sekunden • 75 °C für 2 min 30 Sekunden • 65 °C für 2 min 30 Sekunden • Halten Sie bei 57 °C für 8 bis 24 Stunden
Perform zweite Hybridisierung	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C für 10 Minuten • 85 °C für 2 min 30 Sekunden • 75 °C für 2 min 30 Sekunden • 65 °C für 2 min 30 Sekunden • Halten Sie bei 57 °C für 1,5 bis 4 Stunden
Amplifizieren Sie Enrichment Library	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C für 30 Sekunden • 18 Zyklen von: • 98 °C für 10 Sekunden • 60 °C für 30 Sekunden • 72 °C für 30 Sekunden • 72 °C für 5 Minuten • Halten Sie bei 10 °C

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.



VORSICHT

Für alle Verfahren des Workflows ist eine RNase-/DNase-freie Umgebung erforderlich.

1. Dekontaminieren Sie die Arbeitsbereiche sorgfältig mit RNase-/DNase-hemmendem Reinigungsmittel.
2. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers zur Einrichtung des Ultraschall-Sonicators.
3. Entnehmen Sie die DNA-Kontrollproben aus dem Lagerort.

4. Entnehmen Sie das Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
TEB	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Fragmentieren Sie gDNA

Fragmentieren Sie gDNA

Dieser Prozess fragmentiert gDNA und erzeugt dsDNA Fragmente mit 3' oder 5' Überhängen.

Vorbereitung

- Folgen Sie Empfehlungen in [Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren auf Seite 21](#) zu quantifizieren Proben.
- Bereiten Sie TEB vor: Invertieren oder vortexen Sie zum Mischen.

Prozedur

Bereiten Sie die Platte vor

- Beschriften Sie eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „LP“ (Bibliotheksvorbereitung).
Verwenden Sie eine PCR-Platte, wenn Sie am [SICHERER HALTEPUNKT auf Seite 39](#) unterbrechen.
- Decken Sie ab und stellen Sie zur Verwendung in [Übertragung fragmentierter DNA auf Seite 39](#) in die Lagerung beiseite.

Verdünnen Sie gDNA

- Tauen Sie gDNA-Proben und DNA-Kontrollproben bei Raumtemperatur auf.
- Pipettieren Sie jede gDNA-Probe zehnmal, um sie zu mischen.
- Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen zu sammeln.
- Invertieren Sie TEB zum Mischen oder verwenden Sie einen Vortexmischer.
- Bereiten Sie mithilfe von TEB jede gDNA-Probe in einem Endvolumen von 52 µl vor. In der folgenden Tabelle finden Sie die Zugabemengen und Mindestkonzentrationen basierend auf dem Typ der Probe.
 - Für den Assay ist eine Mindestextraktionskonzentration erforderlich, damit bei einem Volumen von 52 µl mindestens 40 µl TEB zur Verfügung stehen.
 - Verwenden Sie für die DNA-Kontrolle 2 µl in einem Endvolumen von 52 µl.
 - Vermeiden Sie Probenverluste, indem Sie mindestens 2 µl der Probe in diese Verdünnung pipettieren.

Probentyp	Zugabemenge (ng)	Mindestkonzentration (ng/µl)
FFPE	40	3.33
Control (Kontrolle)	40	20

Fragment

1. Geben Sie von jeder gDNA-Probe 52 µl in ein separates Well des Ultraschallröhrchens.



VORSICHT

Geben Sie die gDNA langsam in das Röhrchen und stellen Sie sicher, dass keine Lufteinschlüsse am Röhrchenboden vorhanden sind. Weitere Informationen finden Sie unter [Assay auf Seite 24](#) und in den Anweisungen des Herstellers.

2. Dokumentieren Sie die Ausrichtung des Streifens.
3. Fragmentieren Sie gDNA mit dem Ultraschallgerät in Fragmente.

Übertragung fragmentierter DNA

1. Stellen Sie sicher, dass das Layout der Probenplatte und die Indizes der einzelnen Proben dem Lauf entsprechen, den Sie zur Analyse mit dem TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemodul auswählen.
2. Befolgen Sie die Anweisungen des Ultraschallgeräteherstellers zum Zurückgewinnen der Probe. Bei einigen Röhrchentypen des Ultraschallgeräts ist zur Konsolidierung der Probe im Röhrchen ein Zentrifugationsschritt erforderlich.
3. Übertragen Sie mit einer Pipette mit feinen Spitzen von jeder Probe fragmentierter gDNA dreimal 16,7 µl in einen leeren Well der LP-Platte.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP-Platte an.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, bringen Sie eine selbsthaftende Verschlussfolie an der LP PCR-Platte an und zentrifugieren Sie sie 1 Minute lang bei 280 × g. Führen Sie die Lagerung bei -25 °C bis -15 °C für bis zu 7 Tage durch.

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

Stellen Sie sicher, dass Post-amplification Thermal Cycler Programme eingestellt sind. Beziehen Sie sich auf [Programmieren Sie Thermal Cyclers auf Seite 37](#).

1. Bereiten Sie einen Eiskübel oder vergleichbares vor.
2. Entnehmen Sie die Reagenzien Röhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Auftauen Anweisungen.

Tabelle 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (PN 20031118)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
ERA1-A	-25 °C bis -15 °C	Halten Sie kühl.	Führen Sie End Repair and A-Tailing durch
ERA1-B	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Führen Sie End Repair and A-Tailing durch

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
ALB1	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Ligieren Sie die Adapter
LIG3	-25 °C bis -15 °C	Halten Sie kühl.	Ligieren Sie die Adapter
UMI (weißer Verschluss)	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Ligieren Sie die Adapter
STL	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Ligieren Sie die Adapter
EPM	-25 °C bis -15 °C	Halten Sie kühl.	Index PCR

Tabelle 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (PN 20031119)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
SPB (hellgrünes Etikett)	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Reinigen Sie die Ligation
RSB	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Reinigen Sie die Ligation

Tabelle 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (PN 20031120)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
UPxx	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie die entsprechenden Index-Primer-Röhrchen auf, bis sie Raumtemperatur erreichen.	Index PCR

Tabelle 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (PN 20031126)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
CPxx	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie die entsprechenden Index-Primer-Röhrchen auf, bis sie Raumtemperatur erreichen.	Index PCR

Führen Sie End Repair and A-Tailing durch

In diesem Prozess werden die bei der Fragmentierung entstandenen Überhänge mithilfe eines End Repair A-Tailing master mix (ERA1) repariert und Enden mit A-Tail Überhängen generiert.

Die 3' to 5' Exonuklease Aktivität dieser Mischung entfernt die 3' Überhänge und die 5' to 3' Polymerase Aktivität füllt die 5' Überhänge auf. Die 3' Enden werden während dieser Reaktion A-tailed um zu verhindern dass sie während der adapter ligation Reaktion aneinander ligieren.

Vorbereitung

1. Erwärmen Sie folgendermaßen 2 Mikroproben-Inkubatoren mit MIDI-Hitzeblock-Einsätzen.

- Erwärmen Sie einen Mikroproben-Inkubator auf 30 °C.
 - Erwärmen Sie einen Mikroproben-Inkubator auf 72 °C.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - ERA1-A: Zentrifugieren Sie kurz und pipettieren Sie anschließend zum Mischen. Halten Sie kühl.
 - ERA1-B: Vortexen Sie zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
Untersuchen Sie auf Präzipitate. Wenn vorhanden, erwärmen Sie das Röhrchen auf 37 °C und pipettieren Sie zum Mischen, bis sich die Präzipitate auflösen.
 3. Bereiten Sie ERA1 master mix in einem Mikrozentrifugenröhrchen vor.

Tabelle 13 ERA1 Master Mix*

Master Mix Komponente	4 Bibliotheken	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Berechnungen finden Sie unter [Handhabung von Reagenzien auf Seite 29](#).

4. Pipettieren Sie langsam 10-mal, um Homogenität sicherzustellen, und zentrifugieren Sie dann kurz. Lagern Sie ERA1 master mix gekühlt.
5. Um die Platte vorzubereiten, wählen Sie eine der folgenden Optionen aus:
 - Wenn sich Proben in einer MIDI Platte befinden, bereiten Sie wie folgt vor.
 - a. Beschriften Sie die MIDI Platte in LP2 (Library Preparation 2) um.
 - b. Wenn sich Proben in unterschiedlichen MIDI-Platten befinden, sollten Sie sämtliche Proben in separate Wells derselben MIDI-Platte geben gemäß dem Plattenlayout.
 - Wenn die Platte eingefroren ist, bereiten Sie wie folgt vor.
 - a. Tauen Sie die LP PCR-Platte auf Raumtemperatur auf.
 - b. Zentrifugieren Sie die Platte bei 280 x g für 1 Minute.
 - c. Pipettieren Sie 10-mal zum Mischen.
 - d. Beschriften Sie eine neue 96-well MIDI Platte LP2 (Library Preparation 2).
 - e. Übertragen Sie die gesamten 50 µl jeder Probe von der LP PCR-Platte in den entsprechenden Well der LP2 MIDI-Platte.
 - f. Entsorgen Sie die LP PCR-Platte.

Prozedur

1. Fügen Sie 10 µl ERA1 Master Mix zu jedem Sample Well in der LP2 MIDI Platte hinzu.
2. Entsorgen Sie restliche ERA1-Master-Mischung.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.

- Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
- Inkubieren Sie im vorgewärmten Microsample Inkubator bei 30 °C für 30 Minuten.
- Transferieren Sie sofort in einen zweiten, vorgewärmten Microsample Inkubator.
- Inkubieren Sie bei 72 °C für 20 Minuten.
- Halten Sie die LP2 MIDI Platte für 5 Minuten kühl.

Ligieren Sie die Adapter

Mit diesem Prozess werden Adapter an die Enden der gDNA-Fragmente ligiert.

Vorbereitung



VORSICHT

Verwenden Sie ausschließlich UMI Adapter. SUA1 Adapter werden bereitgestellt, sind jedoch für den TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay nicht erforderlich.

- Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - ALB1: Vortexen Sie zum Mischen für ein Minimum von 10 Sekunden und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - LIG3: Zentrifugieren Sie kurz und pipettieren Sie dann zum Mischen. Halten Sie kühl.
 - UMI: Vortexen Sie zum Mischen für ein Minimum von 10 Sekunden und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - STL: Stellen Sie zur Verwendung im Verfahren beiseite.

Prozedur

- Entfernen Sie die LP2 MIDI Platte von Eis oder Vergleichbarem.
- Fügen Sie 60 µl ALB1 zu jedem Sample Well der LP2 MIDI Platte hinzu. ALB1 ist eine viskose Lösung. Pipettieren Sie langsam, um die Blasenbildung zu minimieren.
- Fügen Sie jedem Proben Well 5 µl LIG3 hinzu.
- Fügen Sie jedem Proben Well 10 µl UMI (weiße Kappe) hinzu.
- Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
- Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
- Inkubieren Sie bei Raum Temperatur für 30 Minuten.
- Vortexen Sie STL zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
- Fügen Sie 5 µl STL zu jedem Proben Well der LP2 MIDI Platte hinzu.
- Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
- Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.

Reinigen Sie die Ligation

Bei diesem Prozess werden die adapterligierten gDNA-Fragmente mit SPB gereinigt und unerwünschte Produkte entfernt. Die Beads werden gewaschen zweimal mit frischem 80 % Ethanol. Die adapterligierten Proben werden mit RSB eluiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - SPB: Stellen Sie sicher, dass die Beads 30 Minuten lang bei Raum Temperatur sind.
 - RSB: Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
2. Bereiten Sie frisches 80 % EtOH in einem 15 ml oder 50 ml konischen Röhrchen vor.

Tabelle 14 Bereiten Sie frisches 80 % Ethanol vor

Reagenz	4 Bibliotheken	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken
100 % EtOH, rein	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Vortexen Sie frisches 80 % EtOH zum Mischen.
4. Stellen Sie den Magneten bereit.

Prozedur

Binden

1. Mischen Sie SPB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
2. Fügen Sie jedem Proben-Well der LP2 MIDI-Platte unmittelbar 112 µl SPB hinzu.
Wenn nutzend ein Trough zu dispensieren SPB, inkludieren ein 1,15 Overage Faktor beim Aliquotieren ausreichend Material pro Probe. Verwerfen jede verbleibend Material nachdem SPB war hinzugefügt zu jedem Probe Well.
3. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
4. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
5. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
6. Platzieren Sie die LP2 MIDI Platte 10 Minuten lang auf dem Magnetstativ.
7. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.

Waschlauf

1. Waschen Sie Beads wie folgt.
 - a. Platzieren Sie die LP2 MIDI-Platte auf dem Magnetstativ und fügen Sie jedem Proben-Well 200 µl frisches 80%iges EtOH hinzu.
 - b. Warten Sie 30 Sekunden.
 - c. Stellen Sie eine Pipette auf 200 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den gesamten Überstand aus jedem Proben-Well. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
2. Waschen Sie die Beads ein **zweites Mal**.
3. Verwenden Sie eine Pipette mit feinen Spitzen zu entfernen restliches EtOH von jedem Well.
4. Verwerfen ungenutztes 80 % EtOH.

Eluieren

1. Entfernen Sie die LP2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Invertieren oder vortexen Sie RSB zum Mischen.
3. Fügen Sie jedem Proben-Well 27,5 µl RSB hinzu.
4. Bringen Sie selbstaftende Verschlussfolie an der LP2 MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
6. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 2 Minuten.
7. Platzieren Sie die LP2 MIDI Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well PCR Platte mit „LS“ (Bibliothekspalten).
9. Übertragen Sie 25 µl von jedem Eluat von der LP2 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der LS PCR-Platte.
10. Entsorgen Sie die leere LP2 MIDI-Platte.

Index PCR

In diesem Schritt werden Bibliotheksfragmente mithilfe von Primern, die Indexsequenzen für das Proben-Multiplexing anfügen, amplifiziert. Das daraus resultierende Produkt enthält die vollständige Bibliothek der DNA-Fragmente mit flankierenden Adaptern, die für die Clusterbildung erforderlich sind.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - EPM: Kühl lagern.
 - UPxx: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie kurz.
 - CPxx: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie kurz.

2. Stellen Sie während der Laufkonfiguration sicher, dass die Indizes der einzelnen Proben dem während der Laufkonfiguration in TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemodul geplanten Lauf entsprechen. Befolgen Sie die Anweisungen hinsichtlich der Index-Auswahl unter [Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes auf Seite 31](#).

**VORSICHT**

Abweichungen zwischen den Proben und Index-Primern führen aufgrund der fehlenden eindeutigen Identifikation der Proben zu falschen Ergebnisberichten.

Prozedur

1. Fügen Sie 5 µl des entsprechenden Index Primer (UPxx oder CPxx) zu dem entsprechenden Sample Well in der LS PCR Platte gemäß der ausgewählten Indizes hinzu.

**VORSICHT**

Bearbeiten und öffnen Sie jeweils immer nur ein Index Primer Röhrchen. Schließen Sie jedes Index Röhrchen unmittelbar nach der Verwendung mit einer neuen Kappe. Kombinieren Sie Index Primer nicht miteinander.

2. Vortexen Sie EPM zum Mischen für 5 Sekunden und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
3. Fügen Sie jedem Proben Well 20 µl EPM hinzu.
4. Bringen Sie einen selbsthaftenden Platten Verschluss an der LS PCR Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
5. Schütteln Sie bei 1200 rpm für 1 Minute.
6. Bringen Sie Pre-amplification Reagenzien zurück in die Lagerung.

**VORSICHT**

Führen Sie alle nachfolgenden Schritte in einem post-amplification Bereich durch, um Amplifikation Produkt Carryover zu vermeiden.

7. Zentrifugieren Sie die LS PCR Platte bei 280 x g für 1 Minute.
8. Platzieren Sie auf dem vorprogrammierten Post-amplification Thermal Cycler und führen Sie das I-PCR Programm aus.
Beziehen Sie sich auf [Programmieren Sie Thermal Cyclers auf Seite 37](#).
Wenn Sie mit [Richten Sie die erste Hybridisierung ein auf Seite 46](#) fortfahren, befolgen Sie die Auftau Anweisungen für Reagenzien in den Bereiten Sie auf das Protokoll vor Schritten.
9. Nach Abschluss des I-PCR Programms zentrifugieren Sie die LS PCR Platte bei 280 x g für 1 Minute.
10. Beschriften Sie die Platte neu als ALS (amplifizierte Library Proben).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, lagern Sie die ALS PCR-Platte bis zu 30 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zur Hybridisierung über Nacht durchzuführen.

1. Stellen Sie sicher, dass Post-amplification Thermal Cycler Programme eingestellt sind. Beziehen Sie sich auf [Programmieren Sie Thermal Cyclers auf Seite 37](#).
2. Entnehmen Sie die Reagenzien Röhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Auftauen Anweisungen.

Tabelle 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20140116)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
TCB1	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Richten Sie die erste Hybridisierung ein

Tabelle 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (PN 20140115)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
TCA1	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Richten Sie die erste Hybridisierung ein

Tabelle 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (PN 20031122)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
OPD2 (weißer Verschluss)	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Richten Sie die erste Hybridisierung ein

Tabelle 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set Box (PN 20140117)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
OPD3 (blauer Verschluss)	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Richten Sie die erste Hybridisierung ein

Richten Sie die erste Hybridisierung ein

Während dieses Prozesses werden zwei Oligo-Pools (OPD2 und OPD3) an gDNA-Bibliotheken hybridisiert, die gemäß [Index PCR auf Seite 44](#) vorbereitet wurden. Die Anreicherung von Zielregionen muss in zwei Hybridisierungsschritten erfolgen. Während der ersten Hybridisierung werden Oligos über Nacht (8 Stunden bis 24 Stunden) an gDNA-Bibliotheken hybridisiert.

Vorbereitung

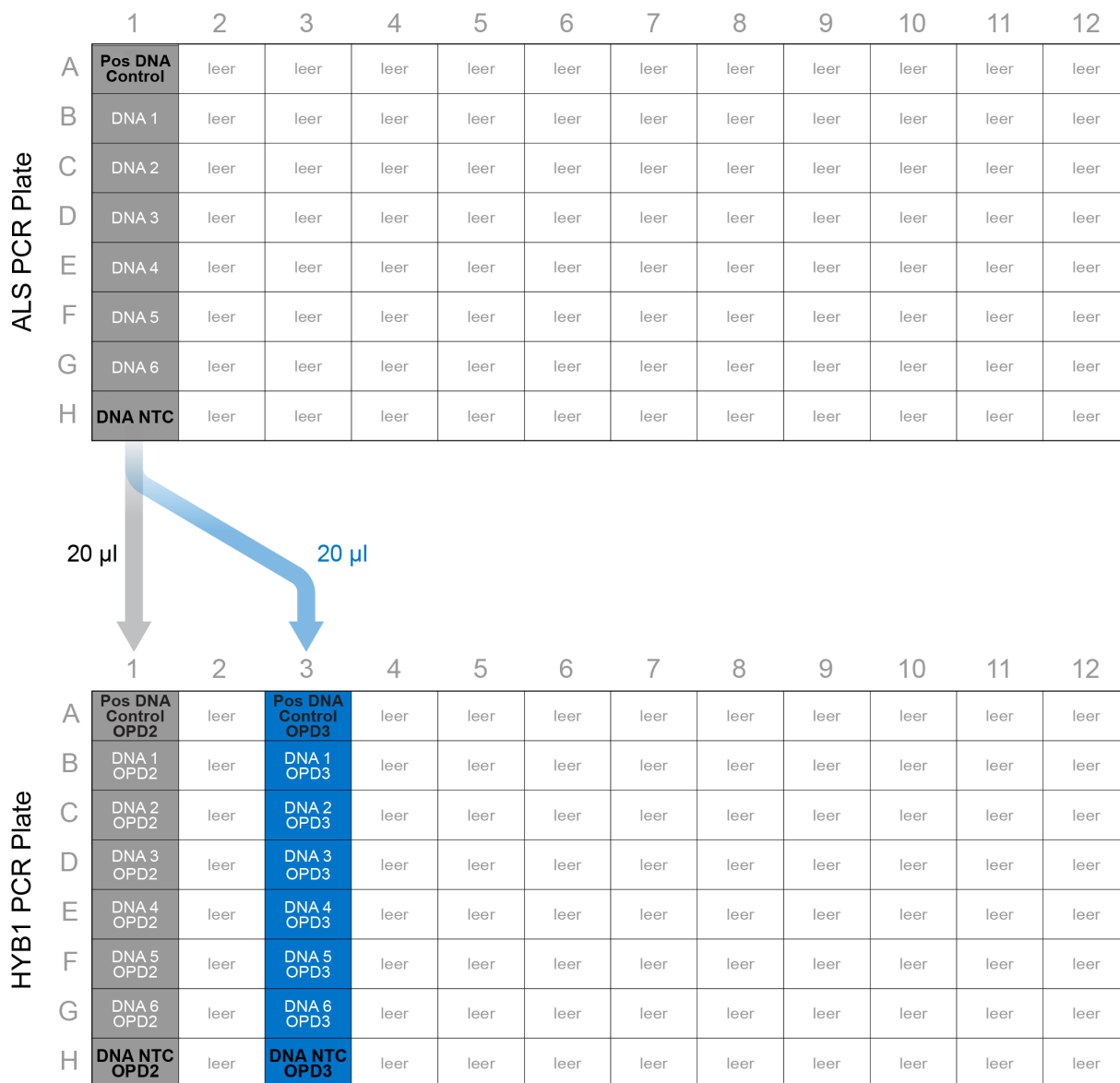
1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - TCB1: Erwärmen Sie das Röhrchen 5 Minuten lang bei 37 °C. Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 - TCA1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

- OPD2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 - OPD3: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
2. Wenn die ALS PCR-Platte gelagert wurde, tauen Sie sie auf Raumtemperatur auf. Zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei $280 \times g$. Pipettieren Sie zum Mischen.
 3. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „HYB1“ (Hybridisierung 1).

Prozedur

1. Transferieren Sie 20 µl jede gDNA Bibliothek von der ALS PCR Platte in das entsprechende Well in der HYB1 PCR Platte für Anreicherung mit OPD2 Sonden. Includieren Sie Positiv Kontrollen und NTCs für Anreicherung mit OPD2 Sonden.
2. Transferieren Sie zusätzliche 20 µl gDNA Bibliothek von der ALS PCR Platte in einen zweiten Well der HYB1 PCR Platte für Anreicherung mit OPD3 Sonden, wie in [Abbildung 3](#) gezeigt. Includieren Sie Positiv Kontrollen und NTCs für Anreicherung mit OPD3 Sonden.

Abbildung 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Erste Hybridisierung Beispiel Platten Layout



3. Bringen Sie einen selbsthaftenden Platten Verschluss an der ALS PCR Platte an und stellen Sie diese beiseite.

Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.

4. Untersuchen Sie TCB1 auf Präzipitate. Wenn Präzipitate vorhanden sind, erwärmen Sie das Röhrchen erneut und vortexen Sie das Röhrchen, bis die Kristalle gelöst sind.
5. Fügen Sie jedem Bibliothek Well der HYB1 PCR Platte 15 µl TCB1 hinzu.
6. Fügen Sie jedem Bibliothek Well der HYB1 PCR Platte 10 µl TCA1 hinzu.
7. Fügen Sie Sonden hinzu.
Kombinieren Sie *nicht* verschiedene Sonden Typen miteinander. Fügen Sie nur ein Sonden Set pro Well hinzu.
 - **[DNA Bibliothek Wells]:** Fügen Sie 5 µl OPD2 (weiße Kappe) zu jeder aus DNA gewonnenen Bibliothek hinzu.
 - **[DNA HRD Bibliothek Wells]:** Fügen Sie 5 µl OPD3 (blaue Kappe) zu jeder Bibliothek abgeleitet von DNA für HRD Anreicherung hinzu.
8. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der HYB1 PCR Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
9. Schütteln Sie bei 1200 rpm für 2 Minuten.
10. Platzieren Sie auf dem Thermal Cycler und führen Sie das HYB1 Programm aus.
Beziehen Sie sich auf [Programmieren Sie Thermal Cycler auf Seite 37](#).
11. Hybridisieren Sie bei 57 °C für mindestens 8 Stunden bis maximal 24 Stunden.
12. Bringen Sie Hybridisierung Reagenzien zurück in die Lagerung.

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

Entnehmen Sie zu Beginn von Tag 2 die Reagenzienröhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen.

Tabelle 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20140116)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
SMB (dunkelblaues Etikett)	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Capture-Ziele, Eins Capture-Ziele, Zwei
ET2	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Capture-Ziele, Eins Capture-Ziele, Zwei
HP3	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Capture-Ziele, Eins Capture-Ziele, Zwei Normalisieren Sie Libraries

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
TCB1	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Richten Sie die zweite Hybridisierung ein
RSB	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Capture-Ziele, Zwei Reinigung Sie die amplifizierte angereicherte Bibliothek

Tabelle 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (PN 20140115)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
EE2	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Capture-Ziele, Eins Capture-Ziele, Zwei Normalisieren Sie Libraries
EEW	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Capture-Ziele, Eins
TCA1	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Richten Sie die zweite Hybridisierung ein

Tabelle 21 TruSight Oncology Comp Content Set Box (PN 20031122)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
OPD2 (weißer Verschluss)	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Richten Sie die zweite Hybridisierung ein

Tabelle 22 TruSight Oncology Comp HRD Content Box (PN 20140117)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
OPD3 (blauer Verschluss)	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Richten Sie die zweite Hybridisierung ein

Capture-Ziele, Eins

In diesem Schritt wird SMB zum Capture von Sonden verwendet, die an Zielregionen von Interesse hybridisiert wurden. Die Beads werden dreimal mit EEW gewaschen. Die Enrichment Libraries werden mit frischem EE2 + HP3 elution mix eluiert und mit ET2 neutralisiert.

Vorbereitung

1. Heizen Sie einen Mikroproben Inkubator mit MIDI Hitze Block Einsatz auf 57 °C vor.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - EEW: Vortexen Sie zum Mischen für 1 Minute.

- EE2: Vortexen Sie zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - HP3: Vortexen Sie zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - SMB: Stellen Sie sicher, dass die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur sind. Stellen Sie sicher, dass Sie **SMB**, nicht SPB, für dieses Verfahren verwenden.
 - ET2: Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
3. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen frische EE2 + HP3 Elution Mix vor.

Tabelle 23 EE2 + HP3-Elutionsmischung für Capture One*

Elution Mischung Komponente	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken	48 Bibliotheken
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Berechnungen finden Sie unter [Handhabung von Reagenzien auf Seite 29](#).

4. Vortexen Sie EE2 + HP3 Elution Mix, und zentrifugieren Sie dann kurz. Stellen Sie für den [Eluieren auf Seite 52](#) Schritt beiseite.
5. Beschriften Sie eine neue 96 Well MIDI Platte CAP1 (Capture 1).
6. Stellen Sie den Magneten bereit.

Prozedur

Binden

1. Entfernen Sie die HYB1 PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Zentrifugieren Sie die HYB1 PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 x g.
3. Mischen Sie SMB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren. Wenn sich ein Niederschlag oder das Bead-Pellet gebildet hat, bringen Sie auf Raumtemperatur, pipettieren Sie, um das Pellet zu lösen, und vortexen Sie dann, um es wieder in Suspension zu bringen.
4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP1 MIDI-Platte unmittelbar 150 µl SMB hinzu. Wenn SMB aus einer Schale entnommen wird, berechnen Sie bei der Bestimmung des für die einzelnen Proben erforderlichen Materials einen Überschussfaktor von 1,05 ein.
5. Entsorgen Sie das übrige Material, nachdem SMB in alle Proben-Wells gegeben wurde.
6. Stellen Sie eine Pipette auf 50 µl ein und übertragen Sie das gesamte Volumen aus jeder Bibliothek der HYB1 PCR-Platte in den entsprechenden Well der CAP1 MIDI-Platte.
7. Entsorgen Sie die leere HYB1 PCR-Platte.
8. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP1 MIDI-Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
9. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
10. Inkubieren Sie die Platte 25 Minuten lang im auf 57 °C vorgewärmten Mikroproben-Inkubator.

11. Platzieren Sie die CAP1 MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
12. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.



VORSICHT

Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt ([Waschlauf auf Seite 52](#)) fort. Lassen Sie das Bead-Pellet nicht längere Zeit ohne Flüssigkeit stehen.

Waschlauf

1. Waschen Sie Beads wie folgt.
 - a. Entfernen Sie die CAP1 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
 - b. Fügen Sie jedem Well 200 µl EEW hinzu.
 - c. Stellen Sie eine Pipette auf 150 µl ein und pipettieren Sie mindestens 10-mal, um die Lösung zu mischen. Stellen Sie sicher, dass alle Beads resuspendiert sind.
Stellen Sie sicher, dass keine Bead-Pellets vorhanden sind, indem Sie die gesamte Bead-Lösung des Wells vorsichtig in die Spitze aspirieren. Überprüfen Sie den Boden jedes Wells mit einer Sichtprüfung. Wenn ein Bead-Pellet vorhanden ist, winkeln Sie während des Waschlaufs die Pipettenspitze in Richtung des Pellets an, um das Pellet zu lösen. Stellen Sie sicher, dass das Bead-Pellet vollständig in der Lösung eingetaucht ist. Die Lösung sollte dunkelbraun aussehen und eine homogene Konsistenz aufweisen.
 - d. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP1 MIDI-Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
 - e. Schütteln Sie 4 Minuten lang bei 1800 rpm.
 - f. Inkubieren Sie die Platte 5 Minuten lang bei 57 °C im Mikroproben-Inkubator.
 - g. Platzieren Sie die CAP1 MIDI-Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
 - h. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.
2. Waschen Sie die Beads ein **zweites** Mal.
3. Waschen Sie die Beads ein **dritte** Mal.
4. Entfernen Sie mit einer Pipette mit feinen Spitzen restliches EEW aus jedem Well.

Eluieren

1. Entfernen Sie die CAP1 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Vortexen Sie frischen EE2 + HP3 Elution Mix und zentrifugieren Sie dann kurz.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP1 MIDI-Platte 17 µl EE2 + HP3-Elutionsmischung hinzu.
4. Entsorgen Sie die verbleibende EE2 + HP3-Elutionsmischung.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP1 MIDI-Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.

6. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „ELU1“ (Elution 1).
9. Mischen Sie ET2 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
10. Fügen Sie jedem entsprechenden Bibliotheks-Well der neuen ELU1 PCR-Platte 5 µl ET2 hinzu.
11. Übertragen Sie vorsichtig 15 µl Eluat aus jedem Bibliotheks-Well der CAP1 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der ELU1 PCR-Platte.
12. Entsorgen Sie die leere CAP1 MIDI-Platte.
13. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ELU1 PCR-Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
14. Schütteln Sie bei 1200 rpm für 2 Minuten.
15. Bringen Sie EEW zurück in die Lagerung.

Richten Sie die zweite Hybridisierung ein

In diesem Schritt werden targeted regions der Enriched gDNA Bibliotheken mit Capture Sonden ein zweites Mal gebunden. Die zweite Hybridisierung stellt hohe Spezifität der gecaptured Regionen sicher. Um optimale Anreicherung von Bibliotheken sicherzustellen, führen Sie den zweiten Hybridisierung Schritt bei 57 °C für ein Minimum von 1,5 Stunden bis zu einem Maximum von 4 Stunden durch.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - TCB1: Erwärmen Sie das Röhrchen 5 Minuten lang bei 37 °C. Mischen Sie das Reagenz 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 - TCA1: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 - OPD2: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 - OPD3: Mischen Sie das Reagenz mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

Prozedur

1. Untersuchen Sie TCB1 auf Präzipitate. Falls vorhanden, erwärmen Sie das Röhrchen erneut und vortexen Sie, bis die Kristalle gelöst sind.
2. Fügen Sie jedem Bibliothek Well in der ELU1 PCR Platte 15 µl TCB1 hinzu.
3. Fügen Sie jedem Bibliothek Well 10 µl TCA1 hinzu.
4. Fügen Sie die gleiche Probe, die während der ersten Hybridisierung verwendet wurde, zu jedem Well hinzu. Fügen Sie nur ein Sonden Set pro Well hinzu.
Kombinieren Sie **nicht** verschiedene Sonden Typen miteinander.

- **[DNA Bibliothek Wells]:** Fügen Sie 5 µl OPD2 (weiße Kappe) zu jeder aus DNA gewonnenen Bibliothek hinzu.
 - **[DNA HRD Bibliothek Wells]:** Fügen Sie 5 µl OPD3 (blaue Kappe) zu jeder aus DNA gewonnenen Bibliothek für HRD Anreicherung hinzu.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der ELU1 PCR-Platte an. Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
 6. Schütteln Sie bei 1200 rpm für 2 Minuten.
 7. Platzieren Sie auf dem Thermal Cycler und führen Sie das HYB2 Programm aus. Beziehen Sie sich auf [Programmieren Sie Thermal Cycler auf Seite 37](#).
 8. Hybridisieren Sie bei 57 °C für ein Minimum von 1,5 Stunden bis zu einem Maximum von 4 Stunden.
 9. Bringen Sie Hybridisierung Reagenzien zurück in die Lagerung.

Capture-Ziele, Zwei

In diesem Schritt wird SMB zum Capture von Sonden verwendet, die an Zielregionen von Interesse hybridisiert wurden. Waschen Sie die Beads einmal mit RSB. Die Enrichment Libraries werden mit frischem EE2 + HP3 elution mix eluiert und mit ET2 neutralisiert.

Vorbereitung

1. Wärmen Sie einen Microsample Inkubator mit MIDI heat block Einsatz auf 57 °C vor.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - EE2: Vortexen Sie zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - HP3: Vortexen Sie zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - SMB: Stellen Sie sicher, dass die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur sind. Stellen Sie sicher, dass Sie **SMB**, nicht SPB, für dieses Verfahren verwenden.
 - RSB: Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
 - ET2: Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
3. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen frische EE2 + HP3 Elution Mix vor.

Tabelle 24 EE2 + HP3 Elution Mix für Capture Targets Zwei*

Elution Mischung Komponente	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken	48 Bibliotheken
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Berechnungen finden Sie unter [Handhabung von Reagenzien auf Seite 29](#).

4. Vortexen Sie zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz. Stellen Sie für den [Eluieren auf Seite 56](#) Schritt beiseite.

5. Beschriften Sie eine neue 96-Well MIDI Platte CAP2 (Capture 2).
6. Stellen Sie den Magneten bereit.

Prozedur

Binden

1. Entfernen Sie die ELU1 PCR-Platte aus dem Thermocycler.
2. Zentrifugieren Sie die ELU1 PCR-Platte 1 Minute lang bei $280 \times g$.
3. Mischen Sie SMB 1 Minute lang mit dem Vortexmischer, um die Beads zu resuspendieren.
4. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP2 MIDI-Platte unmittelbar 150 µl SMB hinzu.
Wenn SMB aus einer Schale entnommen wird, berechnen Sie bei der Bestimmung des für die einzelnen Proben erforderlichen Materials einen Überschussfaktor von 1,05 ein.
5. Entsorgen Sie das übrige Material, nachdem SMB in alle Proben-Wells gegeben wurde.
6. Stellen Sie eine Pipette auf 50 µl ein und übertragen Sie das gesamte Volumen aus jeder Bibliothek der ELU1 PCR-Platte in den entsprechenden Well der CAP2 MIDI-Platte.
7. Entsorgen Sie die leere ELU1 PCR-Platte.
8. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP2 MIDI-Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
9. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
10. Inkubieren Sie die Platte 25 Minuten lang bei 57 °C im Mikroproben-Inkubator.
Wenn Sie mit [Amplifizieren Sie Enrichment Library auf Seite 57](#) fortfahren, befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen von Reagenzien im Abschnitt [Bereiten Sie auf das Protokoll vor](#).
11. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
12. Belassen Sie die CAP2 MIDI-Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.



VORSICHT

Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt ([Waschlauf auf Seite 55](#)) fort. Lassen Sie das Bead-Pellet nicht längere Zeit ohne Flüssigkeit stehen.

Waschlauf

1. Entfernen Sie die CAP2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Invertieren oder vortexen Sie RSB zum Mischen.
3. Fügen Sie jedem Well 200 µl RSB hinzu.
4. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP2 MIDI-Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie 4 Minuten lang bei 1800 rpm.

6. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf dem Magnetstativ.
7. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.
8. Entfernen Sie mit einer Pipette mit feinen Spitzen restliches RSB aus jedem Well.

Eluieren

1. Entfernen Sie die CAP2 MIDI-Platte vom Magnetstativ.
2. Vortexen Sie frischen EE2 + HP3 Elution Mix und zentrifugieren Sie dann kurz.
3. Fügen Sie jedem Bibliotheks-Well der CAP2 MIDI-Platte 22 µl EE2 + HP3-Elutionsmischung hinzu.
4. Entsorgen Sie die verbleibende EE2 + HP3-Elutionsmischung.
5. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der CAP2 MIDI-Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „ELU2“ (Elution 2).
9. Mischen Sie ET2 mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
10. Fügen Sie jedem entsprechenden Bibliotheks-Well der neuen ELU2 PCR-Platte 5 µl ET2 hinzu.
11. Übertragen Sie vorsichtig 20 µl Eluat aus jedem Bibliotheks-Well der CAP2 MIDI-Platte in den entsprechenden Well der ELU2 PCR-Platte.
12. Entsorgen Sie die leere CAP2 MIDI-Platte.
13. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der ELU2 PCR Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
14. Schütteln Sie bei 1200 rpm für 2 Minuten.
15. Bringen Sie SMB, EE2, HP3, RSB und ET2 zurück in die Lagerung.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, zentrifugieren Sie die ELU2 PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

1. Bereiten Sie einen Eiskübel oder vergleichbares vor.
2. Entnehmen Sie die Reagenzien Röhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Auftauen Anweisungen.

Tabelle 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (PN 20140115)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
PPC3	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Amplifizieren Sie Enrichment Library
EPM	-25 °C bis -15 °C	Halten Sie kühl.	Amplifizieren Sie Enrichment Library

Tabelle 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20140116)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
SPB (hellgrünes Etikett)	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Reinigung Sie die amplifizierte angereicherte Bibliothek
RSB	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Reinigung Sie die amplifizierte angereicherte Bibliothek Bereiten Sie auf Sequenzierung vor

Amplifizieren Sie Enrichment Library

Dieser Schritt verwendet Primer zu amplifizieren Enriched Bibliotheken.

Vorbereitung

1. Wenn die ELU2 Platte war gelagert, tauen Sie auf Raum Temperatur auf und dann zentrifugieren bei 280 × g für 1 Minute.

Prozedur

1. Vortexen Sie PPC3 zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
2. Fügen Sie jedem Bibliothek Well der ELU2 PCR Platte 5 µl PPC3 hinzu.
3. Vortexen Sie EPM zum Mischen für 5 Sekunden und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
4. Fügen Sie jedem Bibliothek Well 20 µl EPM hinzu.
5. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der ELU2 PCR Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig, um Verdunstung zu verhindern.
6. Schütteln Sie bei 1200 rpm für 2 Minuten.
7. Platzieren Sie auf einem Thermal Cycler und führen Sie das EL-PCR Programm aus.
Beziehen Sie sich auf [Programmieren Sie Thermal Cyclers auf Seite 37](#).
Wenn Sie mit [Normalisieren Sie Libraries auf Seite 60](#) fortfahren, befolgen Sie die Auftauen Anweisungen im Abschnitt [Bereiten Sie auf das Protokoll vor](#).
8. Bringen Sie PPC3 und EPM zurück in die Lagerung.

Reinigung Sie die amplifizierte angereicherte Bibliothek

Dieser Schritt verwendet SPB zu reinigen die enriched Bibliotheken von unerwünschten Reaktion Komponenten. Die Beads werden gewaschen zweimal mit frischem 80 % Ethanol. Die Bibliotheken werden eluiert mit RSB.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - SPB: Stellen Sie sicher, dass die Beads 30 Minuten lang bei Raum Temperatur sind. Stellen Sie sicher, **SPB** zu verwenden, nicht **SMB**, für dieses Verfahren.
 - RSB: Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
2. Bereiten Sie frisches 80 % Ethanol in einem 15 ml oder 50 ml konischen Röhrchen vor.

Tabelle 27 Bereiten Sie frisches 80 % Ethanol vor

Reagenz	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken	48 Bibliotheken
100 % EtOH, rein	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vortexen Sie frisches 80 % EtOH zum Mischen.
4. Beschriften Sie eine neue 96-well MIDI Platte BIND2 (Clean Up Binding).
5. Stellen Sie den Magneten bereit.

Prozedur

Binden

1. Entfernen Sie die ELU2 PCR Platte von dem Thermal Cycler.
2. Zentrifugieren Sie die ELU2 PCR Platte bei 280 × g für 1 Minute.
3. Vortexen Sie SPB für 1 Minute zu resuspendieren die Beads.
4. Sofort fügen Sie 110 µl SPB zu jedem Bibliothek Well von der BIND2 MIDI Platte hinzu.
Wenn nutzend ein Trough zu dispensieren SPB, inkludieren ein 1,15 Overage Faktor beim Aliquotieren ausreichend Material pro Probe. Verwerfen jede verbleibend Material nachdem SPB war hinzugefügt zu jedem Probe Well.
5. Transferieren Sie 50 µl jede Bibliothek von der ELU2 PCR Platte zu dem korrespondierend Well von der BIND2 MIDI Platte.
6. Verwerfen leere ELU2 PCR Platte.
7. Wenden Sie adhäsiv Platte Seal zu der BIND2 MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
8. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.

9. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
10. Platzieren Sie die BIND2 MIDI Platte auf Magnet Stativ für 5 Minuten.
11. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.

Waschlauf

1. Waschen Sie Beads wie folgt.
 - a. Behalten Sie die BIND2 MIDI Platte auf Magnet Stativ und fügen Sie 200 µl frisches 80 % EtOH zu jedem Well hinzu.
 - b. Warten Sie 30 Sekunden.
 - c. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.
2. Waschen Sie die Beads ein **zweites** Mal.
3. Verwenden Sie eine Pipette mit feinen Spitzen zu entfernen restliches EtOH von jedem Well.
4. Verwerfen ungenutztes 80 % EtOH.

Eluieren

1. Entfernen Sie die BIND2 MIDI Platte von dem Magnet Stativ.
2. Invertieren oder vortexen Sie zu mischen RSB.
3. Fügen Sie 32 µl RSB zu jedem Bibliothek Well hinzu.
4. Wenden Sie adhäsiv Platte Seal zu der BIND2 MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
5. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
6. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 2 Minuten.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften eine neue 96 well PCR Platte PL (Purified Libraries).
9. Transferieren 30 µl jedes eluate von der BIND2 MIDI Platte zu dem korrespondierend well von der PL PCR Platte.
10. Verwerfen die leere BIND2 MIDI Platte.
11. Wenden adhäsiv Platte Seal zu der PL PCR Platte an.
12. Geben SPB und RSB zu Lagerung.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie sind stoppend, zentrifugieren die PL PCR Platte bei 280 x g für 1 Minute und lagern bei -25 °C zu -15 °C für bis zu 30 Tage.

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zum nächsten sicheren Haltepunkt auszuführen.

1. Entnehmen Sie die Reagenzien Röhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Auftauen Anweisungen.

Tabelle 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (PN 20140115)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
LNA1	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Normalisieren Sie Libraries
EE2	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf.	Normalisieren Sie Libraries

Tabelle 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20140116)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
LNB1	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie 30 Minuten lang auf Raumtemperatur.	Normalisieren Sie Libraries
HP3	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Normalisieren Sie Libraries Bereiten Sie auf Sequenzierung vor
LNW1	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Normalisieren Sie Libraries
LNS1	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Normalisieren Sie Libraries

2. Wenn Sie noch am gleichen Tag mit [Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64](#) fortfahren, befolgen Sie die Auftau Anweisungen im Abschnitt Bereiten Sie auf das Protokoll vor.

Normalisieren Sie Libraries

Mit diesem Prozess wird die Menge jeder Library plus Additive (LNA1) normalisiert, um in den gepoolten Libraries eine einheitliche Library Repräsentation zu gewährleisten. Die Beads werden zweimal mit LNW1 gewaschen. Die Libraries werden mit frischem EE2 + HP3 Elution Mix eluiert und mit LNS1 neutralisiert.

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor.
 - LNB1: Stellen Sie sicher, dass die Beads 30 Minuten lang bei Raumtemperatur sind.
 - LNA1: Vortexen Sie zum Mischen.
 - EE2: Vortexen Sie zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
 - HP3: Vortexen Sie zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.

- LNW1: Vortexen Sie zum Mischen. Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
 - LNS1: Vortexen Sie zum Mischen. Stellen Sie für die Verwendung in dem Verfahren beiseite.
2. Puls vortexen Sie LNB1 für 1 Minute, um Beads zu resuspendieren.
Invertieren Sie LNB1 Röhrchen, um sicherzustellen, dass alle Beads resuspendiert sind.
 3. Wiederholen Sie Pulse vortexen für 1 Minute, wenn ein Pellet beobachtet wird.
 4. Verwenden Sie eine Pipette eingestellt auf 800 µl, um LNB1 10 mal auf und ab zu pipettieren, um Resuspension sicherzustellen.
 5. Bereiten Sie sofort frischen LNA1 + LNB1 Master Mix in einem konischen Röhrchen vor.



VORSICHT

Resuspendieren Sie das LNB1 Bead Pellet vollständig am Boden des Röhrchens, um inkonsistente Cluster Dichte zu verhindern.

Tabelle 30 LNA1 + LNB1 Master Mix*

Master Mix Komponente	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken	48 Bibliotheken
LNA1	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Berechnungen finden Sie unter [Handhabung von Reagenzien auf Seite 29](#).

6. Vortexen Sie LNA1 + LNB1 Master Mix. Stellen Sie für den [Binden auf Seite 62](#) Schritt beiseite.
7. Bereiten Sie in einem Mikrozentrifugenröhrchen frischen EE2 + HP3 Elution Mix vor.

Tabelle 31 EE2 + HP3 Elution Mix für Normalize Libraries*

Elution Mischung Komponente	8 Bibliotheken	16 Bibliotheken	24 Bibliotheken	48 Bibliotheken
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Die Werte in dieser Tabelle weisen Volumenüberschüsse auf. Berechnungen finden Sie unter [Handhabung von Reagenzien auf Seite 29](#).

8. Vortexen Sie frischen Elution Mix, und zentrifugieren Sie dann kurz. Stellen Sie für den [Eluieren auf Seite 62](#) Schritt beiseite.
9. Wenn die PL PCR Platte gelagert wurde, tauen Sie auf Raum Temperatur auf, zentrifugieren Sie bei 280 × g für 1 Minute. Pipettieren Sie zum Mischen.
10. Beschriften Sie eine neue 96 Well MIDI Platte BBN (Bead-Based Normalization).
11. Stellen Sie den Magneten bereit.

Prozedur

Binden

1. Vortexen Sie LNA1 + LNB1 Master Mix.
2. Fügen Sie sofort 45 µl LNA1 + LNB1 Master Mix zu jedem Bibliothek Well der BBN MIDI Platte hinzu.
3. Entsorgen Sie restlichen LNA1 + LNB1 master mix.
4. Fügen Sie 20 µl jeder Bibliothek von der PL PCR Platte zum entsprechenden Well der BBN MIDI Platte hinzu.
5. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der BBN MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
6. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 30 Minuten.
7. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der PL PCR Platte an und bringen Sie zurück in die Lagerung.
8. Platzieren Sie die BBN MIDI Platte auf einem magnetischen Stativ für 2 Minuten.
9. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.

Waschlauf

1. Waschen Sie Beads wie folgt.
 - a. Entfernen Sie die BBN MIDI Platte von dem magnetischen Stativ.
 - b. Fügen Sie 45 µl LNW1 zu jedem Bibliothek Well hinzu.
 - c. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der BBN MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
 - d. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 5 Minuten.
 - e. Platzieren Sie die BBN MIDI Platte auf einem magnetischen Stativ für 2 Minuten.
 - f. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ. Entfernen und entsorgen Sie, ohne das Bead-Pellet aufzuwirbeln, mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well.
2. Waschen Sie die Beads ein **zweites** Mal.
3. Verwenden Sie eine Pipette mit feinen Spitzen, um residualen Überstand von jedem Well zu entfernen.

Eluieren

1. Entfernen Sie die BBN MIDI Platte von dem magnetischen Stativ.
2. Vortexen Sie frischen EE2 + HP3 Elution Mix und zentrifugieren Sie dann kurz.
3. Fügen Sie 32 µl EE2 + HP3 Lösung zu jedem Library Well der BBN MIDI Platte hinzu.
4. Entsorgen Sie restlichen Elution Mix.
5. Bringen Sie selbst haftende Platten Verschluss auf der BBN MIDI Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.

6. Schütteln Sie bei 1800 rpm für 2 Minuten.
7. Platzieren Sie die Platte 2 Minuten lang auf einem Magnetstativ.
8. Beschriften Sie eine neue 96-well PCR Platte NL (Normalized Libraries).
9. Transferieren Sie vorsichtig 30 µl Eluat aus jedem Library Well der BBN MIDI Platte in den entsprechenden Well der NL PCR Platte.

**VORSICHT**

Wenn Beads in die Pipetten Spitzen aspiriert werden, geben Sie die Beads zurück auf die Platte auf dem Magnet Stativ, und warten Sie bis die Flüssigkeit klar ist (~2 Minuten) bevor Sie zum nächsten Schritt des Verfahrens fortfahren.

10. Entsorgen Sie die leere BBN MIDI Platte.
11. Vortexen Sie LNS1 zum Mischen.
12. Fügen Sie 30 µl LNS1 zu jedem Bibliothek Well in der neuen NL PCR Platte hinzu.
13. Pipettieren Sie zum Mischen fünf Mal.
14. Bringen Sie selbstaftende Verschlussfolie an der NL PCR Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
15. Bringen Sie LNB1, LNA1, EE2, LNW1, und LNS1 zurück in die Lagerung.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Verfahren anhalten, zentrifugieren Sie NL PCR Platte bei 280 x g für 1 Minute und lagern Sie bei -25 °C bis -15 °C für bis zu 32 Tage.

Bereiten Sie auf das Protokoll vor

Diese Vorbereitung ist erforderlich, um die Protokollschritte bis zur Sequenzierung durchzuführen.

Beginnen Sie mit der Vorbereitung der Sequenzierung Verbrauchsmaterialien aus dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (PN 20028871) mindestens eine Stunde vor deren Verwendung.

1. Nehmen Sie den Library Dilution Buffer (HT1) aus der Lagerung bei -25 °C bis -15 °C. Tauen Sie auf Raum Temperatur auf. Halten Sie es nach dem Auftauen kühl.
2. Befolgen Sie für die anderen Verbrauchsmaterialien im Kit die Anweisungen zur Vorbereitung im *NextSeq 550Dx Instrument Referenz Handbuch (Dokument # 1000000009513)*.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. Entnehmen Sie die Reagenzien Röhrchen aus dem Karton und befolgen Sie die Auftauen Anweisungen.

Tabelle 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
PhiX Kontrolle	-25 °C bis -15 °C	Tauen Sie auf Raum Temperatur auf. Halten Sie es nach dem Auftauen kühl.	Bereiten Sie auf Sequenzierung vor

Tabelle 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123) zusätzlich zu TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20140116)

Reagenz	Lagerung	Auftau Anweisungen	Protokoll Schritt
HP3	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Bereiten Sie auf Sequenzierung vor
RSB (rosa Etikett)	2 °C bis 8 °C	Bringen Sie auf Raumtemperatur.	Bereiten Sie auf Sequenzierung vor

Bereiten Sie auf Sequenzierung vor

Jeder DNA-Sequenzierungslauf muss eine positive Kontrollprobe und eine NTC umfassen. Die NTC wird jeweils nach Bedarf wiederholt sequenziert, sodass jeder Lauf eine NTC umfasst. Jeder Lauf umfasst eine separate positive Kontrollprobe.

Vorbereitung

1. Machen Sie sich mit den Richtlinien für [Anzahl der Bibliotheken und Auswahl der Indizes auf Seite 31](#) vertraut.
2. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „dHP3“ (verdünntes HP3).
3. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „dPhiX“ (verdünntes PhiX).
4. Erwärmen Sie einen Hitzeblock für Mikrozentrifugenröhrchen auf 96 °C.
5. Bereiten Sie einen Eiskübel oder vergleichbares vor.

Verdünnen und denaturieren Sie die PhiX Kontrolle

1. Vortexen Sie HP3 zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
2. Kombinieren Sie folgende Volumen im dHP3 Mikrozentrifugenröhrchen.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Vortexen Sie dHP3 zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
4. Invertieren oder vortexen Sie RSB zum Mischen.
5. Vortexen Sie PhiX Kontrolle zum Mischen, und zentrifugieren Sie dann kurz.
6. Kombinieren Sie die folgenden Volumina im dPhiX Mikrozentrifugen Röhrchen.
 - 8 µl RSB

- 2 µl PhiX Kontrolle
7. Fügen Sie dem dPhiX Röhrchen 10 µl dHP3 hinzu.
 8. Entsorgen Sie das dHP3 Röhrchen.
 9. Vortexen Sie das dPhiX Röhrchen zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 10. Inkubieren Sie dPhiX bei Raum Temperatur 5 Minuten lang zum Denaturieren.
 11. Vortexen Sie HT1 zum Mischen.
 12. Fügen Sie dPhiX sofort 980 µl vorgekühltes HT1 hinzu.
 13. Vortexen Sie zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
 14. Lagern Sie dPhiX gekühlt, bis Sie es im Rahmen der Vorbereitung für die zweite Verdünnung benötigen.
Die finale Konzentration beträgt 20 pM dPhiX.
 15. Bringen Sie PhiX, HP3 und RSB zurück in die Lagerung.

Poolen und Denaturieren von Bibliotheken

1. Wenn die NL PCR-Platte gelagert wurde, tauen Sie sie auf Raumtemperatur auf. Zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei 280 x g.
2. Mischen Sie die Bibliotheken der NL PCR-Platte vorsichtig fünfmal mithilfe einer auf 30 µl eingestellten Mehrkanalpipette.
Verwenden Sie für jede Bibliothek eine neue Spitze.



VORSICHT

Mischen Sie Bibliotheken sorgfältig, um eine optimale Leistung zu ermöglichen.

3. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „PDL“ (Pooled DNA Libraries, gepoolte DNA-Bibliotheken).
4. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „PHL“ (Pooled HRD Libraries, gepoolte HRD-Bibliotheken).
5. Übertragen Sie 10 µl aus jeder normalisierten, mit OPD2 angereicherten DNA-Bibliothek der NL-Platte in das PDL-Röhrchen.
Fassen Sie nicht zwei Bibliotheken mit dem gleichen Index-Primer in einem Pool zusammen.
6. Übertragen Sie 10 µl aus jeder normalisierten, mit OPD3 angereicherten DNA-HRD-Bibliothek der NL-Platte in das PHL-Röhrchen.
Fassen Sie nicht zwei Bibliotheken mit dem gleichen Index-Primer in einem Pool zusammen.
7. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der NL PCR Platte an.
Versiegeln Sie Ränder und Wells vollständig.
8. Mischen Sie PDL- und PHL-Röhrchen mit dem Vortexmischer.
9. Zentrifugieren Sie die PDL- und PHL-Röhrchen kurz.
10. Inkubieren Sie die PDL- und PHL-Röhrchen in einem Hitzeblock 2 Minuten lang bei 96 °C.
11. Lagern Sie die PDL- und PHL-Röhrchen 5 Minuten lang auf Eis.
12. Mischen Sie die PDL- und PHL-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
13. Lagern Sie die PDL- und PHL-Röhrchen erneut auf Eis.

Vorbereiten der ersten Verdünnung

1. Beschriften Sie ein Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL1“ (Verdünnung 1).
2. Übertragen Sie 20 µl PDL in das leere DIL1-Röhrchen.
3. Entsorgen Sie das PDL-Röhrchen.
4. Geben Sie 5 µl PHL in das DIL1-Röhrchen.
5. Geben Sie 475 µl vorgekühltes HT1 in das DIL1-Röhrchen (Verdünnung 1:20).
6. Mischen Sie das DIL1-Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
7. Entsorgen Sie das PHL-Röhrchen.
8. **[Fehlerbehebung]** Wenn nach der Sequenzierung QC-Fehler auf Laufebene oder systemische QC-Fehler der Bibliothek im Zusammenhang mit der beadbasierten Normalisierung beobachtet werden, fahren Sie mit [Workflow zur Fehlerbehebung: Vorbereitung der angepassten zweiten Verdünnung auf Seite 67](#) fort.

Bereiten Sie die zweite Verdünnung vor

1. Beschriften Sie ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit „DIL2“ (Verdünnung 2).
2. Übertragen Sie 40 µl DIL1 in das leere DIL2-Röhrchen.
3. Entsorgen Sie das DIL1-Röhrchen.
4. Geben Sie 1660 µl vorgekühltes HT1 in das DIL2-Röhrchen (Verdünnung 1:850).
5. Mischen Sie das vorbereitete dPhiX (20 pM) mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
6. Geben Sie 2,5 µl vorbereitetes dPhiX (20 pM) in das DIL2-Röhrchen.
7. Vortexen Sie zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
8. Laden Sie 1300 µl DIL2 in die aufgetaute NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles). Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Instrument Referenz Handbuch (Dokument # 1000000009513)*.
9. Entsorgen Sie das DIL2-Röhrchen.
10. Zentrifugieren Sie die NL PCR-Platte 1 Minute lang bei 280 × g und führen Sie die Lagerung der Platte für bis zu 32 Tage bei -25 °C bis -15 °C durch.
11. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort.
Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Instrument Referenz Handbuch (Dokument # 1000000009513)*.

Workflow zur Fehlerbehebung: Vorbereitung der angepassten zweiten Verdünnung

Verwenden Sie diesen Workflow zur Fehlerbehebung, wenn nach der Sequenzierung QC-Fehler auf Laufebene oder systemische QC-Fehler der Bibliothek im Zusammenhang mit der beadbasierten Normalisierung beobachtet werden (weitere Informationen finden Sie unter [Fehlerbehebung auf Seite 71](#)). Clusterdichten außerhalb des Bereichs von 170–220 K/mm² sollten nur angepasst werden, wenn sie mit einem QC-Fehler assoziiert sind. Bereiten Sie nach Abschluss des Schrittes *Vorbereiten der ersten Verdünnung* eine zweite Verdünnung mit angepasstem DIL1- und HT1-Volumen vor.

HINWEIS Die angepasste zweite Verdünnung wird pro Bibliotheksvorbereitung angewendet. Wenn eine hohe oder geringe Clusterdichte einen ungültigen Sequenzierungslauf bzw. eine ungültige Bibliotheks-QC verursacht hat, können nachfolgende Läufe aus derselben Bibliotheksvorbereitung mit demselben Clusterdichtewert angepasst werden. Läufe aus einer neuen Bibliotheksvorbereitung folgen dem Standard-Workflow.

1. Anhand der [Tabelle 34](#) finden Sie den Clusterdichtebereich (K/mm²) einschließlich des im Sequenzierungslauf beobachteten Werts. Beachten Sie das entsprechende angepasste Volumen von DIL1 (µl) und HT1 (µl).

Das kombinierte Reagenzienvolumen beträgt immer 1700 µl, was dem nominalen Verdünnungsvolumen entspricht.

Tabelle 34 Volumenadjustierungen basierend auf Clusterdichte

Clusterdichtebereich (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. Beschriften Sie ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit „TDIL2“ (Verdünnung 2 zur Fehlerbehebung).
3. Übertragen Sie das Volumen von DIL1 aus [Tabelle 34](#) in das leere TDIL2-Röhrchen.

4. Entsorgen Sie das DIL1-Röhrchen.
5. Geben Sie das Volumen des vorgekühlten HT1 aus [Tabelle 34](#) in das TDIL2-Röhrchen.
6. Mischen Sie das vorbereitete dPhiX (20 pM) mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
7. Geben Sie 2,5 µl vorbereitetes dPhiX (20 pM) in das TDIL2-Röhrchen.
8. Vortexen Sie zum Mischen und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
9. Laden Sie 1300 µl TDIL2 in die aufgetaute NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles). Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Instrument Referenz Handbuch (Dokument # 1000000009513)*.
10. Entsorgen Sie das TDIL2-Röhrchen.
11. Zentrifugieren Sie die NL PCR-Platte eine Minute lang bei 280 × g und lagern Sie die Platte anschließend bis zu 32 Tage lang zwischen -25 °C und -15 °C.
12. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort.
Weitere Informationen finden Sie unter *NextSeq 550Dx Instrument Referenz Handbuch (Dokument # 1000000009513)*.

Interpretation der Ergebnisse

Die Sequenzierungsergebnisse des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays werden für jede Probe einzeln in einem PDF- und einem JSON-Bericht dokumentiert. Zusätzlich wird auf Probenebene ein Bericht über geringe Tiefe erstellt (*LowDepthReport.tsv*).

Die folgenden Ausgabedateien werden auf Lafebene erstellt:

- *ControlOutput.tsv*
- *MetricsOutput.tsv*

In den PDF- und JSON-Berichten werden nur Varianten aufgeführt, die die Qualitätskontrolle bestehen.

Ausführliche Informationen zur Analyse finden Sie in *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch (Dokument-Nr. 200080937)*.

Ergebnisse der Begleitdiagnostik

Für die bestimmungsgemäße Verwendung der CDx gibt es drei mögliche Ergebnisse:

- **Positiv:** Eine Variante oder ein Biomarker wurde erkannt (CDx).
- **Nicht erkannt:** Es wurden bei bestimmungsgemäßer Verwendung der CDx keine Varianten oder Biomarker in der Probe erkannt. Der für die Probe ausgewählte Krebstyp ist für die CDx geeignet.
- **Kein Ergebnis:** Eine Bestimmung des Varianten- oder Biomarkerstatus ist aus mindestens einem der folgenden Gründe nicht möglich:
 - Der Sequenzierungslauf entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle.

- Die Bibliothek entspricht nicht den erforderlichen Spezifikationen der Qualitätskontrolle. Für QC-Kategorien, die bestanden haben, wurden keine Begleitdiagnostik-Varianten oder Biomarker nachgewiesen.
- Die Bibliothek entspricht nicht den erforderlichen Spezifikationen für NTC und Positivkontrolle.

Alle CDx-Ergebnisse werden im Abschnitt mit den Ergebnissen der Begleitdiagnostik des JSON-Berichts aufgeführt. Im Abschnitt mit den Ergebnissen der Begleitdiagnostik des PDF-Berichts werden nur die positiven Ergebnisse aufgeführt.

Qualitätskontrolle

Sequenzierung Lauf, Bibliothek, und Kontrolle Validität ist bestimmt automatisch und berichtet von der TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-Analysemodul. Beziehen Sie sich auf [Tabelle 35](#) und [Tabelle 36](#) für die QC Metriken und Spezifikationen angewendet für Sequenzierung Lauf, Bibliothek, und Kontrollen. Wenn die Positiv Kontrolle oder NTC nicht Spezifikationen trifft, die Software automatisch entwertet Patienten Proben basierend auf Kontrolle Probe Ergebnisse. Für detaillierte Analyse Information, siehe *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch (Dokument-Nr. 200080937)*. Der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Bericht, welcher ist verfügbar in PDF und JSON Formaten, fasst Qualität Kontrolle Ergebnisse zusammen. Die Bericht Dateien sind in dem Analyse Ordner. Beziehen Sie sich auf *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch (Dokument-Nr. 200080937)* für die Stelle von dem Analyse Ordner (enthält PDF und JSON Berichte) und dem Lauf Ordner.

Ungültige Sequenzierung Läufe und Bibliotheken sollten sein wiederholt. Für mehr Information auf Wiederholen Sequenzierung Läufe oder Tests von Bibliotheken, Beziehen Sie sich auf [Fehlerbehebung auf Seite 71](#). Führen Sie zusätzliche Qualität Kontrolle Maßnahmen pro das Labor Qualität Management System in Übereinstimmung mit örtlichen, staatlichen, und/oder bundesweiten Vorschriften oder Zulassung Anforderungen durch.

Für Nukleinsäure Quantifizierung Information und Minimum Input Material Anforderungen, siehe [Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren auf Seite 21](#).

Tabelle 35 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Bericht Ergebnis QC Metriken

Ausgabe Typ	Metrik	Spezifikation	Beschreibung	Impact von Spezifikation Fehler*
Sequenzierung Lauf	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Prozent Satz von Reads passierend Filter (PF).	Sequenzierung Lauf entwertet. Keine Ergebnisse berichtet für jede Probe in dem Lauf.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Durchschnitt Prozent von Base Calls mit Qualität Score von Q30 oder höher für Read 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Durchschnitt Prozent von Base Calls mit Qualität Score von Q30 oder höher für Read 2.	
DNA Bibliotheken	CONTAMINATION_SCORE	≤ 1457	Der Kontamination Score basiert auf Variante Allel Frequenz (VAF) Verteilung von SNPs.	Keine DNA Ergebnisse berichtet.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Die Median Fragment Länge in der Probe	Keine BRCA klein DNA Variante Ergebnisse berichtet.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (Anzahl)	≥ 150	Median Exon Fragment Coverage über alle Exon Basen.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Prozent Exon Basen mit 50X Fragment Coverage.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Prozent von chimären Reads.	Keine BRCA Large Rearrangement Ergebnisse berichtet.
	GENE_SCALED_MAD (Anzahl)	$0 \leq x \leq 0,134$	Der Median von absoluten Abweichungen von dem Median von der normalisierten Anzahl von jeder CNV Target Region.	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (Anzahl)	≥ 1,0	Der Median Roh Bin Anzahl pro CNV Target.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50,0	Prozent HRD Sonden mit 50X Fragment Coverage.	Kein GIS Ergebnis berichtet.
	EXCESSIVE_TF (Anzahl)	≤ 0	Fehler Modus Metrik anzeigend ob Tumor Fraktion ist exzessiv und Tumor und normal Signale können nicht mehr sein differenziert für Berechnen GIS.	

* Erfolgreich Ergebnisse zeigen PASS.

Tabelle 36 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Bericht Ergebnis Kontrolle Metriken

Ausgabe Typ	Metrik	Spezifikation	Impact von Spezifikation Fehler*
DNA Positiv Kontrolle	Kleine DNA Variante Sensitivität	51 von 54 spezifizierten Varianten erkannt	Die Software automatisch entwertet Patienten Proben basierend auf Kontrolle Probe Ergebnisse. Keine BRCA klein DNA Variante Ergebnisse berichtet.
	Gen Amplifikation Sensitivität	3 von 3 spezifizierten Varianten erkannt	Die Software automatisch entwertet Patienten Proben basierend auf Kontrolle Probe Ergebnisse. Keine BRCA Large Rearrangement Ergebnisse berichtet.
	PCT_ TARGET_ HRD_50X (%)	≥ 50	Die Software automatisch entwertet Patienten Proben basierend auf Kontrolle Probe Ergebnisse. Kein GIS Ergebnis berichtet.
DNA No-Template Control	MEDIAN_ EXON_ COVERAGE	≤ 8	Die Software automatisch entwertet Patienten Proben basierend auf Kontrolle Probe Ergebnisse. Keine BRCA klein DNA Variante und BRCA Large Rearrangement Ergebnisse berichtet.
	MEDIAN_ TARGET_ COVERAGE	≤ 2	Die Software automatisch entwertet Patienten Proben basierend auf Kontrolle Probe Ergebnisse. Kein GIS Ergebnis berichtet.

* Erfolgreich Ergebnisse zeigen PASS.

Fehlerbehebung

Verwenden Sie [Tabelle 37](#) zur Fehlerbehebung bei Problemen im Workflow. Wenn ein Sequenzierungslauf oder eine Bibliotheksvorbereitung für eine Probe zweimal fehlschlägt, sind möglicherweise weitere Schritte zur Fehlerbehebung erforderlich. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

Bevor Sie die empfohlenen Fehlerbehebungsmaßnahmen durchführen, beachten Sie die beiden allgemeinen Kategorien von Ursachen für Bibliotheken, die die Spezifikationen für die Qualitätskontrolle (QC) nicht erfüllen. Wenn DNA-Bibliotheken die QC nicht bestehen, ist die zugrundeliegende Ursache in der Regel entweder *proben- oder wellspezifisch* oder *systemisch* für den Workflow.

Proben- oder wellspezifische Fehler können sich aus Handhabungsfehlern oder der inhärenten Probenqualität ergeben. Systemische Fehler können durch Einsatz, Geräte, Reagenzien oder Reagenzienhandhabung entstehen und mehrere Bibliotheken beeinträchtigen. Während systemische Fehler am wahrscheinlichsten sind, wenn alle Bibliotheken die QC nicht bestehen, kann die Variabilität der Probenqualität zu systemischen Fehlern führen, die nur eine Teilmenge von Bibliotheken oder eine einzelne Bibliothek betreffen.

Analysieren Sie die folgenden Metriken, um die wahrscheinliche Quelle des ungültigen Ergebnisses zu identifizieren.

- Überprüfen Sie die Gesamt-PF-Reads (erweiterte Metrik) für jede Bibliothek aus der `MetricsOutput.tsv`. Ähnliche Werte weisen auf ein systemisches Problem hin, während wenige Gesamt-PF-Reads für eine oder wenige Proben, einschließlich der Proben, die die Bibliotheksqualitätskontrolle nicht bestehen, auf ein Problem mit einer Probe oder einem Well hindeuten.
- Überprüfen Sie die Gesamt-PF-Reads für die DNA-Positivkontrolle in `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` und vergleichen Sie die Metrik mit historischen Werten. Eine Verringerung dieser Metrik bei einer Positivkontrolle kann auf ein systemisches Problem hinweisen.

Wenn ein Sequenzierungslauf den Spezifikationen der Laufqualitätskontrolle nicht entspricht, liegt als Ursache ein systemischer Fehler vor.

Tabelle 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Fehlerbehebung

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Der Sequenzierungslauf entspricht nicht den Laufqualitätskontrolle-Spezifikationen.	- Pooling-Fehler - Verdünnungsfehler - Probleme bei der Vorbereitung von Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien (z. B. nicht ausreichend aufgetaut, Kondensation/Fremdkörper auf Durchflusszelle)	Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL). Beziehen Sie sich auf Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64 .
	Beadbasierte Normalisierung: hohe Clusterdichte	Wenn ein aufgeführter Fehler vermutet wird, beheben Sie das Problem und sequenzieren Sie die Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL). Beziehen Sie sich auf Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64. Wenn keiner der anderen aufgeführten Fehler vermutet wird, hat die Konzentration der Beads aus dem LNB1-Reagenzienröhrchen möglicherweise eine hohe Clusterdichte verursacht. Dies kann auf unzureichendes Mischen der Beads zurückzuführen sein. Suchen Sie den Clusterdichtewert in der Datei <code>RunCompletionStatus.xml</code> im Laufordner. Der optimale Clusterdichtebereich beträgt 170–220 K/mm², aber auch höhere Werte können Läufe erzeugen, die den QC-Spezifikationen entsprechen. Wenn die Clusterdichte über dem optimalen Bereich liegt und der Sequenzierungslauf den QC-Spezifikationen nicht entspricht, können die Bibliotheken der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL) mit der zweiten Verdünnung erneut sequenziert und an diese angepasst werden. Wiederholen Sie Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64 und befolgen Sie die Anweisungen zur Fehlerbehebung.

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Fehler bei der Berichterstellung oder allgemeiner Fehler im Gerät (Netzwerkfehler, Fehler beim Laden/Entladen von Reagenzien usw.)	Software- oder Geräteproblem.	Beziehen Sie sich auf <i>Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch</i> (Dokument-Nr. 200080937) für Hinweise zur Berichterstellung. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina für zusätzliche Unterstützung.
Die DNA-Bibliothek entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle.	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe wurden nicht erfüllt.	Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe sicher und wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab dem Schritt Fragmentierung der gDNA. Beziehen Sie sich auf Probenanforderungen auf Seite 21 und Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren auf Seite 21 .
	Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler im Assay-Workflow	Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase der vermutete Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina. - Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL). Beziehen Sie sich auf Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64. - Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Beziehen Sie sich auf Fragmentieren Sie gDNA auf Seite 38.

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Die DNA-Bibliothek entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle (fortgesetzt).	CONTAMINATION_SCORE-Kriterien sind nicht erfüllt.	Beachten Sie die Informationen unter Warn- und Vorsichtshinweise zur Vermeidung von Kreuzkontaminierung. Überprüfen Sie das Plattenlayout sowie die Bibliotheksindizierung und stellen Sie sicher, dass Proben mit dem gleichen Index nicht gemeinsam sequenziert wurden. Beginnen Sie für betroffene Proben mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Beziehen Sie sich auf Fragmentieren Sie gDNA auf Seite 38. Die Kontaminierung hat möglicherweise während der Probenextraktion stattgefunden. Unter Umständen muss die Extraktion wiederholt werden, um zu gewährleisten, dass die Probe nicht kontaminiert ist.

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	Die Probe kann übermäßig fragmentiert sein oder eine Nukleinsäurebeschädigung aufweisen, wodurch möglicherweise nicht ausreichend eindeutige Bibliotheken erstellt werden können.	Gehen Sie Konfigurationseinstellungen für das Ultraschallgerät zur DNA-Fragmentierung auf Seite 18 und die Informationen des Herstellers des Ultraschall-Sonicators zu Verwendung und Betrieb (einschließlich Wasserfüllstand und Röhrchentyp) durch. Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe in den Assay sicher. Beziehen Sie sich auf Probenanforderungen auf Seite 21 und Extraktion, Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren auf Seite 21. Wenn die Probe übermäßig fragmentiert oder beschädigt ist, ist möglicherweise eine erneute Probenextraktion und/oder die Wiederholung des Schritts Fragmentierung der gDNA erforderlich.
	• Pooling-Fehler • Verdünnungsfehler • Unvollständige Hitzedenaturierung von PDL/PHL	Schließen Sie die oben aufgeführten DNA-bezogenen Ursachen aus (z. B. Probenzugabe, Probenqualität, Geräte). Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL). Beziehen Sie sich auf Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64.

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Die DNA-Bibliothek entspricht nicht den Spezifikationen der Qualitätskontrolle (fortgesetzt).	Beadbasierte Normalisierung (geringe Clusterdichte)	Wenn keine der anderen möglichen Ursachen für einen QC-Fehler der Bibliothek vermutet wird, kann die Konzentration der Beads aus dem LNB1-Reagenzienröhrchen aufgrund unzureichenden Mischens zu einer geringen Clusterdichte geführt haben. Suchen Sie den Clusterdichtewert in der Datei <code>RunCompletionStatus.xml</code> im run folder und protokollieren Sie ihn. Wenn die Clusterdichte unter 170 K/mm ² liegt und eine systemische beadbasierte Normalisierung vermutet wird (einschließlich dem Nachweis aus Gesamt-PF-Reads für die Positivkontrollen), sequenzieren Sie Bibliotheken von der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL) erneut und befolgen Sie die Anweisungen für eine angepasste zweite Verdünnung. Beziehen Sie sich auf Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64 und Workflow zur Fehlerbehebung: Vorbereitung der angepassten zweiten Verdünnung auf Seite 67 .
	Fehler im Bibliotheksvorbereitungs-Workflow während oder vor dem Index-PCR-Schritt	Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Beziehen Sie sich auf Fragmentieren Sie gDNA auf Seite 38 .
	• Verwenden Sie Anreicherung Sonden falsch. • Fehler im Bibliotheksvorbereitungs-Workflow während oder nach dem ersten Hybridisierungsschritt.	Ein systemischer Sondenpool-Fehler (z. B. Tausch von Sondenpools) kann zu normalen Gesamt-PF-Reads führen, aber die mediane Exon-Coverage besteht die QC nicht. Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Beziehen Sie sich auf Fragmentieren Sie gDNA auf Seite 38 .

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
Fehlschlagen der Positivkontrolle	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe an die positive Kontrollprobe wurden nicht erfüllt. Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler im Assay-Workflow	Stellen Sie die ordnungsgemäße Zugabe in den Assay sicher. Prüfen Sie das Plattenlayout und stellen Sie sicher, dass sich die passenden Reagenzien (Sonden, Indizes) in den entsprechenden Wells befinden. Stellen Sie eine Lagerung der positiven Kontrollprobe entsprechend dem Etikett sicher. Wiederholen Sie für alle Proben, die die positive Kontrollprobe gemeinsam nutzen, die Bibliotheksvorbereitung ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase die vermutete Anwendung oder ein Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina. - Sequenzieren Sie Bibliotheken erneut mithilfe der PCR-Platte der Normalized Libraries (NL). Beziehen Sie sich auf Bereiten Sie auf Sequenzierung vor auf Seite 64. - Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Beziehen Sie sich auf Fragmentieren Sie gDNA auf Seite 38.

Beobachtung	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
NTC-Fehler	Es liegt eine Kreuzkontaminierung oder eine Kontaminierung des Arbeitsbereichs vor.	Beachten Sie unter Warn- und Vorsichtshinweise die Informationen zur Dekontaminierung der Arbeitsbereiche und zur Vermeidung einer Kreuzkontamination. Überprüfen Sie das Plattenlayout sowie die Bibliotheksindizierung und stellen Sie sicher, dass Proben mit dem gleichen Index nicht gemeinsam sequenziert wurden. Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung aller Bibliotheken, die die No-Template Control gemeinsam nutzen, ab dem Beginn des Workflows.
	Fehlerhafte Indizierung der Bibliothek.	
Positive und/oder negative Kontrollproben im Sequenzierungslauf wurden nicht als Kontrollproben analysiert.	Falsche Zuordnung des Probentyps während der Einrichtung des Sequenzierungslaufs.	Wiederholen Sie die Analyse mit korrekt angegebenen Kontrollproben wie in der Workflow-Anleitung des Analysemoduls erläutert (beziehen Sie sich auf <i>Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-Analysemodul-Workflow-Handbuch</i> (Dokument-Nr. 200080937)).

Leistungsmerkmale

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ist ein Assay, der die Beurteilung von HRD anhand von DNA ermöglicht, die aus FFPE-Tumorgewebeproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom extrahiert wurde. Es werden zwei NGS-Panels verwendet. Ein Panel wird zum Nachweis von deletären und vermutlich deletären Veränderungen in den Genen BRCA1 und BRCA2 verwendet, einschließlich kleiner DNA-Varianten und großer Rearrangements. Ein zweites NGS-Panel wird verwendet, um die genomische Instabilität zu messen, die als GIS ausgegeben wird. BRCA-positiv ist definiert als Nachweis einer deletären oder vermutlich deletären Veränderung entweder im BRCA1- oder im BRCA2-Gen. GIS-positiv ist definiert als $\text{GIS} \geq 42$. HRD-positiv ist definiert als BRCA-positiv und/oder GIS-positiv.

Die Studien umfassten FFPE-Proben mit spezifischen CDx-positiven Varianten.

Sofern nicht anders angegeben, nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall (KI) von 95 %.

Tabelle 38 enthält die Definitionen der in den unterschiedlichen Studien berechneten Metriken.

Tabelle 38 Definitionen der Metriken

Begriff	Definition
Übereinstimmung positiver Ergebnisse in Prozent (PPA)	Der prozentuale Anteil der positiven Ergebnisse der Vergleichsmethode, bei denen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) positiv ist.
Übereinstimmung negativer Ergebnisse in Prozent (NPA)	Der prozentuale Anteil der negativen Ergebnisse der Vergleichsmethode, bei denen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) negativ ist.
Prozentsatz positiver Calls (PPC)	Prozentualer Anteil der Beobachtungen mit positivem Ergebnis für ein Ziel an den Beobachtungen, für die ein positives Ergebnis für das Ziel zu erwarten ist.
Prozentsatz negativer Calls (PNC)	Prozentualer Anteil der Beobachtungen mit negativem Ergebnis für ein Ziel an den Beobachtungen, für die ein negatives Ergebnis für das Ziel zu erwarten ist.
n/N	Die Anzahl der positiven oder negativen Beobachtungen (n) geteilt durch die Gesamtzahl der Beobachtungen (N) zur Berechnung des PPC bzw. PNC. Die Werte von n und N können auf verschiedenen Ebenen liegen (z. B. Variante oder Gen) oder über eine Gruppe hinweg kombiniert werden (z. B. SNVs).
Standardabweichung (SD)	Ein Maß für die Streuung der Werte einer Variablen um ihren Mittelwert.
Variationskoeffizient in Prozent (%CV)	Standardabweichung geteilt durch den Mittelwert in Prozent.

Genauigkeit

Die Genauigkeit des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays für den Nachweis von HRD bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurde anhand der Beurteilung der Konkordanz der Ergebnisse für HRD-Status, GIS-Status und BRCA-Status zwischen dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay und einem validierten NGS-basierten Vergleichsassay belegt. Die Genauigkeit wurde anhand der orthogonalen Methode geschätzt; PPA, NPA und das zugehörige zweiseitige Wilson-Score-KI von 95 % wurden berechnet.

Mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay und der orthogonalen Methode wurden 175 FFPE-DNA-Proben des Ovarialkarzinoms getestet. Bei einer Probe waren die Ergebnisse mit TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ungültig, und bei einer anderen Probe waren die Ergebnisse mit dem Vergleichsassay ungültig. Der auswertbare Datensatz für den GIS- und den HRD-Status betrug 173 Proben. Der auswertbare Datensatz für den BRCA-Status betrug 169, da vier zusätzliche Proben mit BRCA-Varianten außerhalb des Messbereichs des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays ausgeschlossen wurden. Die Übereinstimmungsanalysen auf Grundlage gültiger Testergebnisse sind in [Tabelle 39](#), [Tabelle 40](#) und [Tabelle 41](#) dargestellt.

Tabelle 39 Konkordanz zwischen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay und Vergleichsmethode zum Nachweis des HRD-Status

		Ergebnis der Vergleichsmethode		
		HRD-positiv	HRD-negativ	Summe
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay-Ergebnis	HRD-positiv	97	6	103
	HRD-negativ	6	64	70
	Summe	103	70	173
Übereinstimmungsstatistik	PPA % (n/N; 95-%-KI)	94,2 % (97/103; 87,9 %, 97,3 %)		
	NPA % (n/N; 95-%-KI)	91,4 % (64/70; 82,5 %, 96,0 %)		

Tabelle 40 Konkordanz zwischen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay und Vergleichsmethode zum Nachweis des GIS-Status

		Ergebnis der Vergleichsmethode		
		GIS positiv	GIS negativ	Summe
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay-Ergebnis	GIS positiv	95	3	98
	GIS negativ	6	69	75
	Summe	101	72	173
Übereinstimmungsstatistik	PPA % (n/N; 95-%-KI)	94,1 % (95/101; 87,6 %, 97,2 %)		
	NPA % (n/N; 95-%-KI)	95,8 % (69/72; 88,5 %, 98,6 %)		

Tabelle 41 Konkordanz zwischen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay und Vergleichsmethode zum Nachweis des BRCA-Status

		Ergebnis der Vergleichsmethode		
		BRCA-positiv	BRCA-negativ	Summe
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay-Ergebnis	BRCA-positiv	40	8	48
	BRCA-negativ	2	119	121
	Summe	42	127	169
Übereinstimmungsstatistik	PPA % (n/N; 95-%-KI)	95,2 % (40/42; 84,2 %, 98,7 %)		
	NPA % (n/N; 95-%-KI)	93,7 % (119/127; 88,1 %, 96,8 %)		

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays wurde an drei externen Teststandorten mit zwei Bedienern pro Standort, zwei Replikaten innerhalb des Laufs und drei Chargen an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen bewertet. An jedem der drei Standorte führten zwei Bediener unabhängig voneinander Tests an separaten NextSeq 550Dx Geräten durch. Die Tests wurden mit einem Reproduzierbarkeitspanel aus 27 Bestandteilen durchgeführt, das DNA enthielt, die aus FFPE-Proben aus Ovarialgewebe mit bekannten BRCA1- und BRCA2-Mutationen und/oder einem bekannten GIS extrahiert wurde.

Von den 27 Panel-Bestandteilen wurden 16 Panel-Bestandteile auf kleine DNA-Varianten in BRCA-Genen untersucht, darunter: SNVs, Varianten in Homopolymerregionen ≥ 5 bp, Insertionen und Deletionen < 10 bp und Insertionen und Deletionen ≥ 10 bp. Für den BRCA-LR-Variantentyp wurden zwei Panel-Bestandteile für BRCA-LR-Varianten < 3 Exons und ein Panel-Bestandteil für die BRCA-LR-Varianten ≥ 3 Exons verwendet. Für den GIS stellten drei Panel-Bestandteile den Status „Hoher GIS (+)“ dar, drei Panel-Bestandteile den Status „GIS (-)“, zwei Panel-Bestandteile den Status „Niedriger GIS (+)“ und einer der Panel-Bestandteile, der bereits die LR-Varianten < 3 Exons repräsentierte, stellte auch einen Bestandteil mit niedrigem GIS (+) dar. An jedem Standort testete jeder Bediener die Panel-Bestandteile im Laufe von drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen und generierte sechs Beobachtungen pro Ziel pro Panel-Bestandteil. An allen drei Standorten wurden damit 36 Beobachtungen pro Panel-Bestandteil generiert (drei Standorte $\times$ zwei Bediener/Geräte $\times$ drei Tage $\times$ zwei Replikate innerhalb eines Laufs).

PPC und PNC für untersuchte Panel-Bestandteile wurden bestimmt. Analysen wurden durchgeführt, um PPC und PNC (mit den zugehörigen 95-%-KIs) zu schätzen, indem die Ergebnisse von sechs Bedienern an drei Standorten kombiniert wurden. Für jede untersuchte kleine DNA-Variante und LR-Variante wurden Beobachtungen mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay bei Panel-Bestandteilen, bei denen für die untersuchte Variante negative Ergebnisse erwartet wurden, zur Berechnung des PNC-Wertes kombiniert. Beobachtungen mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay bei Panel-Bestandteilen mit GIS (-) wurden kombiniert, um den PNC-Wert für Panel-Bestandteile mit GIS (-) zu berechnen.

Kleine DNA-Varianten im BRCA-Gen

Die PPC-Werte für die Panel-Bestandteile für die kleinen BRCA-DNA-Varianten sowohl mit hohem Grad (2–3 × C95) als auch mit niedrigem Grad (1–1,5 × C95) betrugen alle 100 % (Tabelle 42). Die PNC-Werte für die Panel-Bestandteile für die kleinen BRCA-DNA-Varianten betrugen ebenfalls alle 100 % (Tabelle 43).

Tabelle 42 PPC für untersuchte kleine BRCA-DNA-Varianten nach Variantengrad und Variantenklasse

Variante Grad	Variante Klasse	Targeted Variante	Mean VAF	PPC (%) (n/N)	95 % KI
Hoch	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)
	Varianten in Homopolymerregionen ≥ 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)
	Insertion oder Deletion (< 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)
	Insertion oder Deletion (≥ 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)
Niedrig	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)
	Varianten in Homopolymerregionen ≥ 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)
	Insertion oder Deletion (< 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)
	Insertion oder Deletion (≥ 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)

Tabelle 43 PNC für untersuchte kleine BRCA-DNA-Varianten nach Variante Klasse

Variante Klasse	Targeted Variante	PNC (%) (n/N)	95 % KI
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)
Varianten in Homopolymerregionen ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	100 (566/566)	(99,3, 100)
	BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	100 (492/492)	(99,2, 100)
Insertion oder Deletion (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)

Variante Klasse	Targeted Variante	PNC (%) (n/N)	95 % KI
Insertion oder Deletion (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

In [Tabelle 44](#) ist die Varianzkomponentenanalyse nach Variationsquelle für hohe Grade und niedrige Grade für jede Klasse der kleinen BRCA-DNA-Varianten aufgeführt. Die Mean VAF über die untersuchten kleinen BRCA-DNA-Varianten mit einem hohen Grad lag zwischen 0,121 und 0,248 und die über die untersuchten kleinen BRCA-DNA-Varianten mit einem niedrigen Grad zwischen 0,087 und 0,147. Die Gesamt-SD über die untersuchten kleinen BRCA-DNA-Varianten reichte von 0,019 (11,4 % CV) bis 0,041 (28,7 % CV) für kleine BRCA-DNA-Varianten mit einem hohen Grad und von 0,016 (18,9 % CV) bis 0,043 (30,1 % CV) für kleine BRCA-DNA-Varianten mit einem niedrigen Grad.

Tabelle 44 Varianzkomponentenanalyse der VAF bei untersuchten kleinen BRCA-DNA-Varianten

Variante Grad	Variante Klasse	Targeted Variante	N	Mean VAF	Site SD (%CV)	Bediener/Geräte-SD (%CV)	Tag SD (%CV)	Lot SD (%CV)	Wiederholbarkeit-SD (%CV)	Total SD (%CV)
Hoch	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)
	Varianten in Homopolymerregionen ≥ 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)
	Insertion oder Deletion < 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)
	Insertion oder Deletion ≥ 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)
	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)
Niedrig	Varianten in Homopolymerregionen ≥ 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)
	Insertion oder Deletion < 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)
	Insertion oder Deletion ≥ 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)

Large Rearrangement Varianten in BRCA

PPC Werte für die targeted BRCA LRs waren 100 % (29/29) für BRCA2 LR $\geq$ 3 exons, 97,2 % (35/36) für BRCA2 LR < 3 exons, und 94,3 % (33/35) für BRCA1 LR < 3 exons ([Tabelle 45](#)). PNC Werte für die targeted BRCA LRs waren 98,9 % (630/637) für BRCA1, und 100 % (607/607) für BRCA2 ([Tabelle 46](#)).

Tabelle 45 PPC für Targeted BRCA LRs nach Variante Klasse

Variante Klasse	Targeted Variante	Mean VAF	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
LR $\geq$ 3 exons	BRCA2 LOSS	0.448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 exons	BRCA2 LOSS	0.602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	BRCA1 LOSS	0.680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tabelle 46 PNC für Targeted BRCA LRs

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

[Tabelle 47](#) zeigt die Varianz Komponenten Analyse nach Variation Quelle für jede BRCA LR Klasse. Die mean VAF für die LR $\geq$ 3 exons Variante war 0,448 mit einer Gesamt SD von 0,026 (5,7 % CV). Die mean VAF für die LR < 3 exons Varianten reichte von 0,602 bis 0,680, und die Gesamt SD reichte von 0,038 (6,3 % CV) bis 0,079 (11,6 % CV).

Tabelle 47 Variance Komponenten Analyse von VAF in Targeted BRCA LRs

Variante Klasse	Targeted Variante	N	Mean VAF	Site SD (%CV)	Bediener /			Wiederholbarkeit SD (%CV)	Total SD (%CV)
					Instrument SD (%CV)	Tag SD (%CV)	Lot SD (%CV)		
LR $\geq$ 3 exons	BRCA2 LOSS	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 exons	BRCA2 LOSS	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 LOSS	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)

Genomic Instability Score (GIS)

PPC Werte waren 100 % für High GIS (+) Panel Mitglieder. Low GIS (+) Panel Mitglieder hatten PPC Werte im Bereich von 94,4 % bis 100 % ([Tabelle 48](#)). PNC Werte waren 100 % über alle GIS (-) Panel Mitglieder ([Tabelle 49](#)).

Tabelle 48 PPC für GIS nach Targeted GIS Status und Panel Mitglied

Targeted GIS Status	Targeted GIS	Mean GIS	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
High 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)
Low 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)

Tabelle 49 PNC für GIS Negative Targeted Panel Mitglieder

Targeted GIS Status	Targeted GIS	Mean 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)

Tabelle 50 zeigt die Varianz Komponenten Analyse nach Variation Quelle für jeden targeted High GIS (+), Low GIS (+), und GIS (-) Panel Mitglied. Der mean GIS über die GIS targeted Panel Mitglieder reichte von 60,1 bis 70,2 für High GIS (+), von 46,3 bis 53,1 für Low GIS (+), und von 18,2 bis 23,3 für GIS (-). Die Gesamt SD über die targeted GIS Panel Mitglieder reichte von 2,5 (3,5 % CV) bis 3,2 (5,2 % CV) für High GIS (+), von 1,5 (2,9 % CV) bis 3,8 (7,2 % CV) für Low GIS (+), und von 2,5 (11,7 % CV) bis 3,3 (14,1 % CV) für GIS (-) Panel Mitglieder.

Tabelle 50 Variance Komponenten Analyse von GIS in Targeted Panel Mitglieder

Targeted GIS Status	Targeted GIS	N	Mean GIS	Site SD (%CV)	Bediener /		Lot SD (%CV)	Wiederholbarkeit SD (%CV)	Total SD (%CV)
					Instrument SD (%CV)	Tag SD (%CV)			
High 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)
Low 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)

Leerwertgrenze

Der Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse (von den insgesamt erwarteten negativen Ergebnissen) wurde durch Replikattests von gutartigem FFPE-Gewebe aus dem Eierstock ermittelt. Es wurde erwartet, dass das Gewebe GIS-negativ ist und keine deletären oder vermutlich deletären BRCA1- oder BRCA2-Mutationen (kleine

DNA-Varianten und LR) enthält. Sieben gutartige FFPE-DNA-Proben aus dem Eierstock wurden für jede der beiden Reagenzienchargen im 8-Plex-Format doppelt mit zwei Bedienern über drei Tage analysiert. Eine Teilmenge der Proben wurde erneut gepoolt und im 3-Plex-Format erneut sequenziert, um falsch positive Ergebnisse mit verschiedenen, von diesem Gerät unterstützten Multiplex-Konfigurationen zu evaluieren. Insgesamt gab es 168 mögliche Beobachtungen. Der Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse wurde für kleine BRCA-DNA-Varianten auf Positionsebene (ca. 3 Millionen Positionen), für BRCA-LRs auf Genebene und für GIS auf Probenebene berechnet. Der Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse pro Variantentyp wird in [Tabelle 51](#) dargestellt.

Tabelle 51 Falsch positive Ergebnisse nach Variantentyp

Variantentyp	Falsch positive Ergebnisse*
Kleine BRCA-DNA-Varianten	0 % (0/3.076.657)
BRCA-LR	0 % (0/384)
GIS	0 % (0/192)

* Denominatoren sind die Gesamtzahlen der Läufe im 8- und 3-Plex-Format.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) von kleinen BRCA-DNA-Varianten (SNVs, Insertionen oder Deletionen ≥ 10 bp, Insertionen oder Deletionen < 10 bp, Varianten in Homopolymerregionen ≥ 5 bp), BRCA-LRs < 3 Exons und ≥ 3 Exons und des GIS wurden in Tumor-FFPE-DNA-Proben bestimmt. Die LoD ist der geringste Analytwert, der konsistent erkannt werden kann (Hit-Rate von 95 % oder Wahrscheinlichkeit für Fehler zweiter Art von 5 %). Die LoD für den GIS wurde als der geringste Tumoranteil, der einen GIS-Nachweis von ≥ 95 % erreicht, und für kleine BRCA-DNA-Varianten und LR als Variantenallelfrequenz (VAF) definiert. FFPE-DNA-Proben des Ovarialkarzinoms wurden für kleine BRCA-DNA-Varianten, GIS und BRCA-LR ≥ 3 Exons verwendet. Aufgrund der Nichtverfügbarkeit von FFPE-Gewebe des Ovarialkarzinoms wurde eine FFPE-DNA-Probe des Mammakarzinoms für BRCA-LR < 3 Exons verwendet. Die Proben wurden auf mehrere Testebenen verdünnt. So gab es 12 Beobachtungen für jede Testebene pro Reagenziencharge pro Variante, die von mehreren Bedienern an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen unter Verwendung von zwei Reagenzienchargen generiert wurden. Die größere LoD der beiden Reagenzienchargen wurde als Nachweisgrenze für die Variante verwendet ([Tabelle 52](#)).

Tabelle 52 Nachweisgrenze für kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs, GIS

Variantentyp	Variante Klasse	C95
Kleine BRCA-DNA-Varianten	SNV	0,05 VAF
	Insertionen oder Deletionen ≥ 10 bp	0,06 VAF
	Insertionen oder Deletionen < 10 bp	0,07 VAF
	Varianten in Homopolymer- regionen ≥ 5 bp	0,07 VAF

Variantentyp	Variante Klasse	C95
Große BRCA-Rearrangements	LR < 3 Exons	0,61 VAF
	LR ≥ 3 Exons	0,46 VAF
GIS	GIS	33 % Tumoranteil

Störende Substanzen

Die Auswirkungen potenzieller endogener und exogener Substanzen auf die Leistung des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays wurden mit der endogenen Substanz (Hämoglobin) bewertet, mit der Proben während des Nukleinsäureextraktionsprozesses versetzt wurden, sowie mit körperfremden Substanzen (Ethanol, Proteinase K, Waschpuffer, Paraffin, Xylol und überschüssigen Index-Primern), die vor der Bibliotheksvorbereitung der gereinigten Nukleinsäure zugesetzt wurden. Vier Replikate der Probenbibliotheken wurden von einem oder mehreren Bedienern generiert. Für alle Substanzen wurden 10 FFPE-Proben des Ovarialkarzinoms für die Analyse von kleinen BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs und den GIS verwendet. Die Auswirkung von Nekrose wurde auch anhand einer weiteren Gruppe von drei FFPE-Proben des Ovarialkarzinoms mit unterschiedlich stark nekrotisiertem Gewebe (10 %–20 %) untersucht. Für jede Nekroseprobe wurde eine makrodissezierte Kontrollprobe ohne Nekrose hinzugefügt. Vier Replikate von DNA-Bibliotheken und deren Kontrollen wurden gemeinsam verarbeitet. Für alle Störsubstanzen wurden Probenreplikate pro Substanz mit ihren jeweiligen Kontrollreplikaten verglichen. Hämoglobin (4 mg/ml), Ethanol (5 %), Proteinase K (2-Faches der repräsentativen Konzentration der Extraktionsmethode), Waschpuffer (2,5 %), Paraffin (25 % des homogenisierten vorverdauten Gewebes), Xylol (0,0001 %), Index-Primer (30 % Überschuss) beeinträchtigen den Nachweis kleiner BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs oder des GIS nicht. Die VAF-Werte für die kleinen BRCA-DNA-Varianten und der GIS wurden durch das Vorhandensein eines oder mehrerer der getesteten Störfaktoren nicht beeinflusst. Das Vorhandensein von nekrotischem Gewebe (bis zu 20 %) wirkte sich nicht auf die Bestimmung von kleinen BRCA-DNA-Varianten oder des GIS aus. BRCA-LRs wurden aufgrund der Nichtverfügbarkeit einer nekrotischen FFPE-Probe des Ovarialkarzinoms mit einer BRCA-LR-Variante nicht auf Nekrose untersucht.

Zuverlässigkeitsprüfung der Zugabetitration für Nukleinsäuren

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Erfordert eine feste Zugabe von 40 ng DNA-Probe. Die Leistung des Assays wurde anhand von neun DNA-Proben bewertet, die aus FFPE-Ovarialgewebe extrahiert wurden, um Toleranzen für Nukleinsäure-Zugabevariationen festzulegen, die zu einem Assay-Fehler oder negativen Auswirkungen auf die Assayausgabe führen könnten. Jede FFPE-Probe enthielt eine oder mehrere kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs oder GIS und wurde dreifach auf fünf Zugabestufen (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominal], 60 ng und 100 ng) getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass der Nachweis kleiner BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LR-Calling und GIS-Status nicht von einem Unterschied in der Zugabemenge beeinflusst wurden.

Die Ergebnisse zeigten auch, dass zweifach unter der nominalen Stufe liegende Nukleinsäure-Zugaben eine erhöhte Anzahl von QC-Fehlern aufwiesen, was zu weniger Proben führte, die für das Varianten-Calling untersucht wurden. Bei der Zugabestufe 20 ng wurde aufgrund von Fehlern bei der prozentualen Exon-Coverage bei 50X (PCT_EXON_50X) und bei der medianen Exon-Coverage (MEDIAN_EXON_COVERAGE) eine Bibliotheksvaliditätsrate von 55,5 % erzielt. Die VAF der kleinen BRCA-DNA-Varianten und der GIS waren auf der Zugabestufe 20 ng nicht betroffen.

Kreuzkontamination

Die Kreuzkontaminierung wurde untersucht, um festzustellen, ob falsch positive Ergebnisse aufgrund Well-zu-Well-Kontaminierung während der Vorbereitung der Probenbibliothek oder durch eine Lauf-zu-Lauf-Kontaminierung zwischen aufeinanderfolgenden Sequenzierungsläufen auftreten. Die Analyse wurde für kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LR und GIS durchgeführt. Die Bibliotheken wurden aus charakterisierten FFPE-Proben des Ovarialkarzinoms in Schachbrettanordnung mit wechselnden Proben zur Untersuchung der Well-zu-Well-Kontaminierung und mit wechselnden Indizes zur Untersuchung von Kontaminierungen bei aufeinanderfolgenden Sequenzierungsläufen (Lauf zu Lauf) auf dem gleichen NextSeq 550Dx-Gerät vorbereitet. Die Untersuchung der Kreuzkontamination zeigte bei Untersuchung der erkannten Varianten in jeder Probe eine Kontaminierungsrate von 0,8 % (2/252 Kontaminierungsvorfällen). Bei der Analyse von Empfängerbibliotheken basierend auf dem Varianten-Calling für kleine BRCA-DNA-Varianten und BRCA-LR wurden keine Kontaminierungsvorfälle gefunden. Die beiden beobachteten Kontaminierungsvorfälle waren falsch positive Ergebnisse für den GIS in GIS-Empfängerproben, da die intrinsische GIS-Variation und der GIS dieser beiden Proben nahe dem Entscheidungsschwellenwert lagen.

Die Studie hat gezeigt, dass bei dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay nur ein geringes Auftreten von Well-zu-Well- oder Lauf-zu-Lauf-Kreuzkontaminationen zu erwarten ist. Zusammen mit den Kontaminationsmetriken in der Software mindern diese Ergebnisse das Risiko falscher Variantenergebnisse aufgrund einer Probenkontamination.

Bewertung des Kits zur Extraktion der Nukleinsäuren

Drei im Handel erhältliche DNA-Extraktionskits wurden mit TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) bewertet. Die drei Extraktionskits verwendeten unterschiedliche Entparaffinierungsmittel und Nukleinsäurebindungsschritte ([Tabelle 53](#)). Vornehmlich wurde Kit 3 zur Bestimmung der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Leistung verwendet.

Fünf FFPE-Proben des Ovarialkarzinoms wurden einer Nukleinsäureextraktion unterzogen (drei Kits x zwei Bediener x drei Tage x zwei Replikate), um DNA zu erhalten (insgesamt 36 Beobachtungen). Die qualitative Analyse zeigte, dass es keinen erkennbaren Unterschied beim Varianten-Calling für die einzelnen Variantentypen (kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs, GIS) gab, da alle Variantenbeobachtungen PPC-Werte > 97 % aufwiesen. Die quantitative Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied bei den Kits in Bezug auf die VAF der kleinen BRCA-DNA-Varianten und auf den GIS.

Tabelle 53 Kit-Eigenschaften

Kit	Name des Kits	Entparaffinierungsmittel	Nukleinsäurebindung
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE-Gewebe	Xylen	Spalte
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Mineralöl	Magnetische Beads
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Proprietäre Entparaffinierungslösung	Spalte

Reagenz Stabilität

Echtzeitstabilität

Die Echtzeitstabilität wurde anhand von sechs FFPE-Gewebeproben des Ovarialkarzinoms beurteilt. Drei Reagenzienchargen wurden über sechs Zeitpunkte in ähnlichen Abständen (nach 3 Monaten, 6 Monaten, 9 Monaten, 13 Monaten, 19 Monaten und 25 Monaten) getestet. Zwei Bediener führten die Bibliotheksvorbereitung für jede Charge durch, die auch drei Replikate jeder Probe enthielt, was insgesamt sechs Replikate pro Charge ergibt. Der aggregierte PPC betrug für untersuchte kleine BRCA-DNA-Varianten 100 %, für untersuchte BRCA-LRs ≥ 92 % und für den GIS ≥ 83 %. Darüber hinaus gab es keine signifikanten Unterschiede im Zusammenhang mit der Zeit für den GIS oder für die VAF der kleinen BRCA-DNA-Varianten.

Anbruchstabilität der Kits

Die Anbruchstabilität des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay-Kits wurde unter normalen Anwendungsbedingungen über die gesamte Haltbarkeitsdauer für mehrere Anwendungen des Kits untersucht. Die eingefrorenen Komponenten des Reagenzienkits wurden mehrfach eingefroren und aufgetaut und gekühlte Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und für bis zu vier Verwendungen getestet. Alle Kriterien der Qualitätskontrolle wurden für alle getesteten Einfrier- und Auftauzyklen sowie Zeitpunkte erfüllt. Das Varianten-Calling wurde für kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs und den GIS untersucht. Den Ergebnissen zufolge kann das Kit bis zu vier Male eingefroren und aufgetaut werden. Zusätzlich wurde ein Reagenzienkit verwendet, um insgesamt 24 DNA-Proben durch einen Bediener vorzubereiten, was zeigte, dass ein ausreichendes Reagenzienvolumen für 24 DNA- und 24 HRD-Bibliotheken vorhanden ist.

Transportstabilität

Die Kittransportstabilität des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays wurde anhand von neun FFPE-Proben des Ovarialkarzinoms bewertet, um die Funktionalität der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Reagenzienkits nach Exposition gegenüber simulierten Vertriebsbedingungen zu zeigen. Mit acht FFPE-Proben des Ovarialkarzinoms wurde die Funktionalität nach der Exposition der Reagenzienkits gegenüber simulierten internationalen Sommer- und Wintertemperaturprofilen gezeigt. Funktionstests wurden nach der Exposition mit den oben genannten Proben durchgeführt und bestanden aus sechs bis 12 Replikaten jeder Probe pro Bedingung. Die physikalischen Attribute der Kits wurden ebenfalls beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass

sie sich in allen Testfällen nach der Auslieferung nicht verändert hatten. Die Funktionstests ergaben, dass der Versand für kleine BRCA-DNA-Varianten (PPC $\geq 96\%$), BRCA-LRs (PPC $\geq 94\%$) und GIS (PPC = 100 %) im Vergleich zur Kontrollbedingung keine negativen Auswirkungen auf das Varianten-Calling hatte.

Probenstabilität

Stabilität der Nukleinsäure

Die Stabilität von Nukleinsäuren (DNA) und die damit verbundene Quantifizierung für die Verwendung mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay wurden anhand von FFPE-Gewebeproben des Ovarialkarzinoms beurteilt. FFPE-Blöcke wurden geschnitten und DNA wurde extrahiert. Die extrahierte Nukleinsäure wurde gründlich gemischt, quantifiziert, auf Nukleinsäurequalität überprüft und in zwei Sätze von Einwegröhrchen aliquotiert, die für zwei Zeitpunkte eingefroren wurden: T0 (Kontrolle) und T1 (zur Unterstützung von 28 Tagen). Die gesamte extrahierte DNA wurde bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bis sie an T0 oder T1 mit mehreren Replikaten und Bedienern getestet wurde. T1 wurde mit T0 in Bezug auf kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs und den GIS verglichen. Die Daten weisen darauf hin, dass Nukleinsäuren und die damit verbundene Quantifizierung, die mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay verwendet werden soll, bei Lagerung bei den empfohlenen Temperaturen (DNA bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) bis zu 28 Tage lang stabil bleiben.

Bibliotheksstabilität

Die Stabilität von Bibliotheken, die jeden der fünf sicheren Haltepunkte für den Assay (siehe [Tabelle 54](#)) nutzten, wurde anhand von mehreren FFPE-Gewebeproben des Ovarialkarzinoms und einer FFPE-Gewebeprobe des Mammakarzinoms bewertet. Kontrollbibliotheken (T0, keine Haltepunkte) wurden unmittelbar nach Abschluss des Workflows sequenziert. Aliquots aus den gleichen Bibliotheken wurden an den Haltepunkten bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die Zeit (T1) aufbewahrt, um die in [Tabelle 54](#) aufgeführten Tage zu unterstützen. T1 wurde mit T0 in Bezug auf kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs und den GIS verglichen. Die Daten zeigen, dass die aus dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay generierten Bibliotheken gemäß der Gebrauchsanweisung stabil sind.

Tabelle 54 Aufbewahrungsdauer für Bibliotheken

Bibliothekstyp	Platte	Anzahl der Tage
Fragmentierte gDNA	LP PCR	≤ 7
Vor der Anreicherung	ALS PCR	≤ 30
Nach der Anreicherung	ELU2 PCR	≤ 7
PCR, nach der Anreicherung	PL PCR	≤ 30
Normalisiert	NL PCR	≤ 32

Stabilität von FFPE-Gewebe auf Trägern

Die Stabilität von FFPE-Gewebe auf Trägern, das mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay verwendet wird, wurde durch Sektionierung von FFPE-Blöcken (5-µm-Abschnitte) aus zehn FFPE-Gewebeproben des Ovarialkarzinoms überprüft. Die Proben wurden auf Trägern bei Raumtemperatur (22 °C) gelagert und zu zwei Zeitpunkten geprüft: T0 (Kontrolle) und T1 (zur Unterstützung von 28 Tagen). Nukleinsäurematerial wurde quantifiziert und dann innerhalb von 24 Stunden jedes Zeitpunkts mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay verarbeitet. Zu jedem Zeitpunkt wurden mehrere Replikate pro Probe von mehreren Bedienern getestet. T1 wurde mit T0 in Bezug auf kleine BRCA-DNA-Varianten, BRCA-LRs und den GIS verglichen. Das Varianten-Calling wurde bewertet. Die Daten deuten darauf hin, dass FFPE-Gewebe auf Trägern, das mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) verwendet wird, bei Raumtemperatur bis zu 28 Tage stabil ist.

Bridging-Studie zur klinischen HRD-Performance

Zur Validierung des TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assays als CDx für die Auswahl von Patientinnen mit Ovarialkarzinom für eine Behandlung mit LYNPARZA (Olaparib) wurden Restproben von Patientinnen, die in die klinische Studie PAOLA-1 (NCT02477644) aufgenommen wurden, getestet, um eine klinische Bridging-Studie zu unterstützen.

Die Studie wurde durchgeführt, um die Konkordanz des HRD-Status zwischen dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay und dem in PAOLA-1 verwendeten klinischen Studien-Assay (Clinical Trial Assay, CTA) zu beurteilen und um die klinische Wirksamkeit von Olaparib bei den HRD-positiven Patientinnen, die durch den TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay identifiziert wurden, zu beurteilen. PAOLA-1 war eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase-III-Studie zur Untersuchung der klinischen Wirksamkeit von Olaparib plus Bevacizumab als Erstlinien-Erhaltungstherapie für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom. Der HRD-Status der Patientinnen wurde nach der Randomisierung vor der Primäranalyse mithilfe des CTA bestimmt. Primärer Endpunkt war das progressionsfreie Überleben (Progression-Free Survival, PFS), definiert als die Zeit ab der Randomisierung bis zur Progression nach Einschätzung des Prüfarztes gemäß den modifizierten RECIST-1.1-Kriterien oder bis zum Tod. Von den 806 in die PAOLA-1-Studie randomisierten Patientinnen standen 399 Restproben für Tests mit TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) zur Verfügung. Die demografischen Daten der Patientinnen mit verfügbaren TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Ergebnissen waren denen in der PAOLA-1-Studie ähnlich. Ebenso waren die Merkmale der Teilnehmerinnen im Allgemeinen bei denjenigen, die mit TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positiv waren, und denjenigen, die gemäß dem CTA HRD-positiv waren, ähnlich.

Konkordanzergebnisse

Von den 399 Proben, die für Tests mit TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) zur Verfügung standen, lieferten 382 ein auswertbares Ergebnis. Die 17 nicht auswertbaren Proben ergaben kein Ergebnis aufgrund von Fehlern bei der Testqualitätskontrolle (N=12) oder der pathologischen Untersuchung (N=5) (Ungültigkeitsrate des Assays: 3 % [12/394]). Insgesamt 365 aufgenommene Patientinnen hatten Proben mit auswertbaren CTA- und

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Ergebnissen. Die Übereinstimmung der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Ergebnisse relativ zu den CTA-Ergebnissen zwischen Proben mit gültigen Ergebnissen ist in [Tabelle 55](#) dargestellt.

Tabelle 55 Konkordanz zwischen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) und CTA zum Nachweis von HRD

		CTA-Ergebnis		
		HRD-positiv	HRD-negativ	Summe
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay-Ergebnis	HRD-positiv	204	12	216
	HRD-negativ	5	144	149
	Summe	209	156	365
Übereinstimmungsstatistik	PPA % (n/N; 95%-KI*)	97,6 % (204/209; 94,5 %, 99,2 %)		
	NPA % (n/N; 95%-KI*)	92,3 % (144/156; 86,9 %, 96,0 %)		
	OPA % (n/N; 95%-KI*)	95,3 % (348/365; 92,6 %, 97,3 %)		

* KI basierend auf exakter Binomialmethode (Clopper und Pearson, 1934).

Ergebnisse bezüglich der klinischen Wirksamkeit

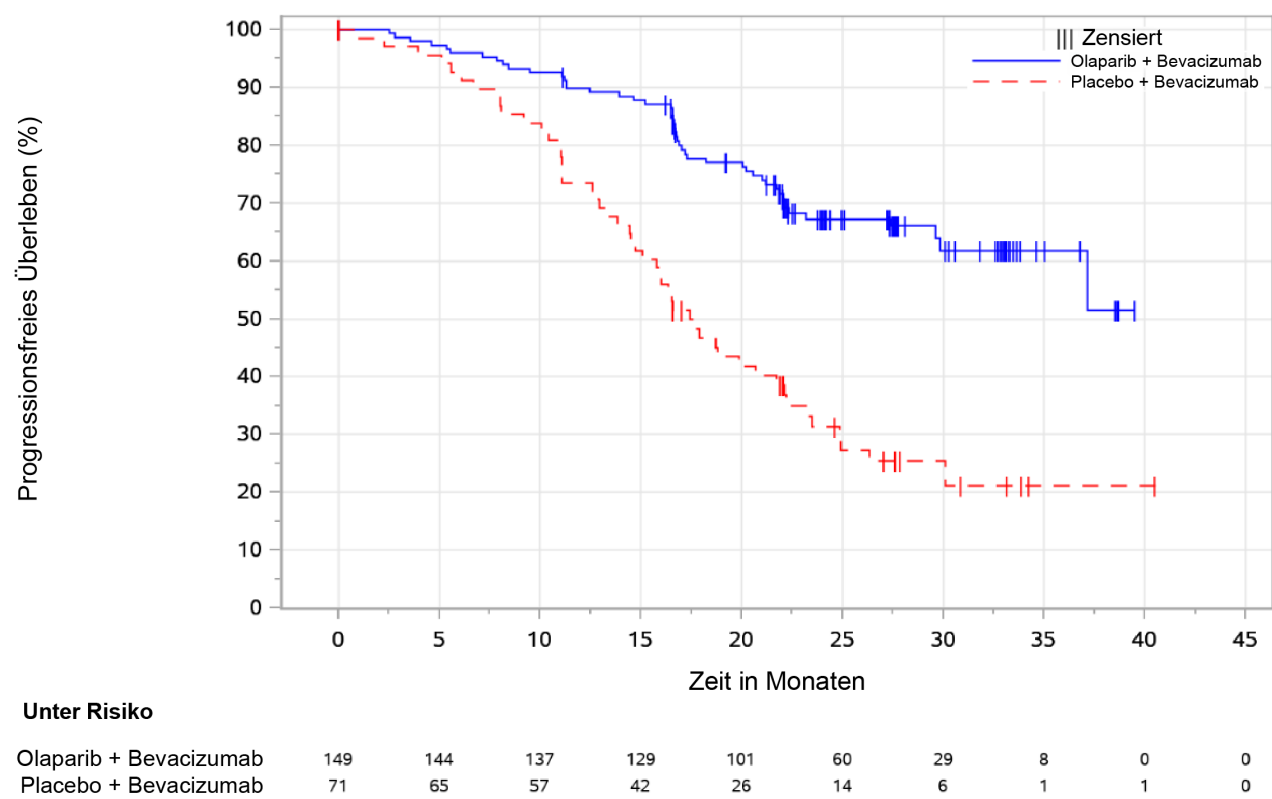
Die klinische Leistung von TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) wurde durch Bestimmung der klinischen Wirksamkeit in der HRD-positiven Population ermittelt. PFS-Hazard Ratios (HR) für die Behandlungsgruppen Olaparib bzw. Placebo wurden unter Verwendung eines unbereinigten proportionalen Cox-Hazard-Modells berechnet. [Tabelle 56](#) zeigt die PFS-Hazard Ratios bei den Teilnehmerinnen, die mit dem CTA und mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positiv waren. [Abbildung 4](#) zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für PFS bei Teilnehmerinnen, die mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) positiv waren. Bei mit dem CTA und mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positiven Populationen betrug die PFS-Hazard Ratio 0,33 (95%-KI: 0,25, 0,45) bzw. 0,32 (95%-KI: 0,22, 0,48) und stellte eine Reduktion des Risikos für Progression oder Tod bei Teilnehmerinnen in der Gruppe mit Olaparib plus Bevacizumab um 67 % im Vergleich zur Gruppe mit Placebo plus Bevacizumab (68 %) dar. Eine Sensitivitätsanalyse zur Wirksamkeit von imputierten fehlenden CDx-Ergebnissen zeigte, dass die PFS-Hazard Ratios in den imputierten HRD-positiven Populationen mit den Schätzwerten der Primäranalyse übereinstimmten.

Tabelle 56 Klinische Wirksamkeit mit dem CTA und mit dem TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-Assay

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

¹ PFS-Median in Monaten
² Aus der Produkt-Limit-Methode (Kaplan-Meier) für zensierte Daten
³ Basierend auf dem unstratifizierten Cox-Regressionsmodell mit Behandlung als Kovariate
⁴ NR = Nicht erreicht (Not Reached)

Abbildung 4 Kaplan-Meier-Kurve – PFS bei mit TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) identifizierten HRD-positiven Teilnehmerinnen



Quellen

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). Veröffentlicht 2014. Aktualisiert im Oktober 2023. Aufgerufen am 7. März 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

Versionsverlauf

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200080934 v00	Mai 2026	Erste Version.

Patente und Marken

Dieses Dokument und sein Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung des hier beschriebenen Produkts/der hier beschriebenen Produkte und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und sein Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina zu keinem anderen Zweck verwendet oder verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keinerlei Lizenzen unter seinen Patent-, Marken-, Urheber- oder Gewohnheitsrechten bzw. ähnlichen Rechten Dritter.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Verwendung des Produkts/der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGE SACHSCHÄDEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2026 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

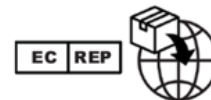
Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformationen



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
92122 San Diego, California, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



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

Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, finden Sie im Symbolschlüssel unter „support.illumina.com“ auf der Registerkarte *Documentation* (Dokumentation) für Ihr Kit.

Ein Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP, Summary of Safety and Performance) ist nach Einführung der Europäischen Medizingerätedatenbank (Eudamed) unter <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> abrufbar. Dieser ist mit der Basis-UDI-DI (0081627002TSOHRDDGRK) verknüpft.