

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) illumina®

(EU) -pakkausseloste

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN. VAIN VIENTIIN.

Suunniteltu käyttötarkoitus

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) on kvalitatiivinen *in vitro* -diagnostiikkatesti, jossa käytetään kohdennettua uuden sukupolven sekvensointia homologisen rekombinaation puutoksen (HRD) arviointiin munasarjasyöpäpotilaiden formaliinifiksoiduista, parafiiniin valetuista (FFPE) kasvainkudosnäytteistä eristettyä DNA:ta käyttämällä Illumina® NextSeq™ 550Dx -laitteen avulla. Testiä voidaan käyttää yksittäisten nukleotidivarianttien, insertioiden, deleetioiden ja suurten uudelleenjärjestymien havaitsemiseen BRCA1- ja BRCA2-geeneissä ja Genomic Instability Score -pistemäärän (GIS) raportoimiseen.

Testi on tarkoitettu käytettäväksi kytkösdiaagnostiikkana, jonka avulla tunnistetaan syöpäpotilaat, jotka voivat hyötyä kohdassa [Taulukko 1](#) luetellusta kohdennetusta hoidosta hyväksytyjen tuotteen hoitomerkinntöjen mukaan.

Taulukko 1 Kytkösdiaagnostiikan käyttöaihe

Kasvaintyyppi	Havaitut biomarkerit	Hoito
Munasarjasyöpä, mukaan lukien epiteelialinen munasarjasyöpä, munanjohdinten syöpä ja peritoneaalinen primaarisyöpä	Homologisen rekombinaation puutos (HRD) (määritellään BRCA1- ja BRCA2-geenien haitallisiksi tai epäillyiksi haitallisiksi mutaatioiksi ja/tai positiivisiksi GIS-pisteiksi)	LYNPARZA® (olaparibi)

Määrityksen yhteenveto ja selitys

Kliininen kuvaus

Munasarjasyövällä on suurin kuolleisuus gynekologisten maligniteettien joukossa.¹ Munasarjasyöpään kuuluvat epiteelialiset munasarja-, munanjohdin- ja primaariset vatsakalvon syövät, joilla kaikilla on yhteinen biologinen alkuperä ja joita arvioidaan yhdessä hoitotarkoituksia varten.^{2,3} Noin puolella potilaista, joilla on vaikea-asteinen seroosinen ja endometrioidinen munasarjasyöpä (huomioitavat soveltuvat histologiset alaluokat), on genomivikoja homologisen rekombinaation korjausreitillä, mikä johtaa HRD:hen.⁴ HRD:n esiintymiseen liittyy herkkyys platinapohjaiselle solunsalpaajahoidolle⁵ ja kliininen vaste poly(adenosiinidifosfaatti-[ADP]-riboosi)-polymeraasin (PARP) estäjille (PARPi), joita käytetään munasarjasyövän kohdennetussa hoidossa,⁶⁻¹² mikä johtaa parempaan etenemättömyysaikaan ja kokonaiselinaikaan.^{5,13,14} Alkuvaiheen kliinisten tutkimusten^{6,7,12,15} löydösten mukaan soveltuvuus PARPi-hoitoon munasarjasyövässä pohjautuu yleisesti HRD-positiiviseen tilaan.¹⁶ PAOLA-1 oli vaiheen III satunnaistettu, kaksoissokkoutettu, lumelääkekontrolloitu monikeskustutkimus,

jossa tutkittiin olaparibin ja bevasitsumabin yhdistelmän kliinistä tehoa ensilinjan ylläpitohoitona potilailla, jotka sairastavat edennyttä munasarjasyöpää.¹² TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN) -määritys validoitiin kliiniseen PAOLA-1-tutkimukseen mukaan otettujen potilaiden näytteitä käyttäen.

Useista homologisen rekombinaation korjausreittiä haittaavista taustamekanismeista parhaiten karakterisoituja ovat ituradan ja/tai somaattiset loss-of-function-mutaatiot BRCA1- ja BRCA2-geeneissä.^{4,13,17} Testit, joilla arvioidaan genomista epästabiliutta (esim. substituutiot, deletiot, kopioluvun muutokset ja rakenteelliset uudelleenjärjestymät), arvioivat geenijäljen tai mutaation tunnusmerkkien esiintymistä, joka osoittaa HRD:n esiintymisen taustalla vaikuttavasta syystä riippumatta. GIS on genomisen epästabiliuden mittari, joka yhdistää tietoa suurista tilamuutoksista (LST), heterotsygotian menetyksestä (LOH) ja telomeerien alleelisesta epätasapainosta (TAI). Saatavilla olevat kliiniset tutkimustiedot tukevat GIS:n kliinistä validiteettia biomerkkiaineena, jolla tunnistetaan BRCA:n villityypin munasarjasyöpäpotilaat, jotka hyötyvät merkittävästi PARPi-hoidosta.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) on kvalitatiivinen kytkösdiagnostiikan (CDx) seuraavan sukupolven sekvensointitesti (NGS), joka raportoi HRD-tilan munasarjasyöpäpotilailla havaitsemalla pieniä DNA-variantteja ja eksonitason deletioita (joita kutsutaan suuriksi uudelleenjärjestymiksi [LR]) BRCA1- ja BRCA2-geeneissä ja arvioimalla GIS:iä suhteessa raja-arvoon 42.

Varianttittunnistuksen ulkopuolelle jätetyt BRCA1- ja BRCA2-geenien alueet luetellaan asiakirjassa *TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) -estoluettelo (asiakirjan numero 200066147)*, joka on saatavilla [Illumina -tukisivustolta](#).

Menetelmän periaatteet

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määritys on jaettu testi, joka suoritetaan manuaalisesti käyttämällä uutettua nukleiinihappoa syötemateriaalina. FFPE-kudoksesta uutettua DNA:ta käytetään sellaisten kirjastojen valmisteluun, jotka rikastetaan sen jälkeen syöpään liittyvien geenien suhteen ja sekvensoidaan NextSeq 550Dx -laite -laitteella.

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määritys sisältää seuraavat prosessit.

- **Kirjaston valmistelu ja rikastus** – FFPE-kudoksesta leikataan 40 ng genomi-DNA:ta (gDNA) pieniksi fragmenteiksi. Yleiskäyttöiset sekvensointiadapterit yhdistetään ligaatiolla gDNA-fragmentteihin. P5- ja P7-adapterisekvenssit sisällytetään kuhunkin kirjastoon, jotta kirjastofragmentit voidaan siepata virtauskyvetin pintaan sekvensoinnin aikana. Adaptereissa on i5- ja i7-sekvenssit kunkin yksittäisen näytteen tunnistamiseksi ja yksittäisten molekyylien tunnistamiseksi ainutkertaisilla molekyylitunnisteilla (UMI). Kirjastot rikastetaan sen jälkeen tiettyjen kohdegeenien osalta sieppaukseen perustuvalla menetelmällä. Kirjastoihin hybridisoidaan biotinyloituja kohdesekvenssejä, jotka sisältävät määrityksen kohdegeenialueita. Koettimet ja hybridisoidut kohdekirjastot eristetään muista kuin kohdekirjastoista sieppaamalla streptavidiniimagneettipartikkeleita käyttäen. Rikastetut kohdekirjastot pestään ja monistetaan. Sen jälkeen kunkin rikastetun kirjaston määrä normalisoidaan helmiin perustuvalla menetelmällä, jotta voidaan varmistaa yhtä suuri edustus poolatuissa kirjastoissa sekvensointia varten.

- **Sekvensointi ja ensisijainen analyysi** — Normalisoidut, rikastetut kirjastot poolataan ja klusteroidaan virtauskyvetiin ja sen jälkeen sekvensoidaan synteetikemialla (SBS) NextSeq 550Dx -laitteessa. SBS-kemiassa käytetään palautuvan terminaattorin menetelmää fluoresoivasti merkittyjen yksittäisten deoksinukleotiditriposfaattipohjien (dNTP) toteamiseen, kun ne sisällytetään kasvaviin DNA-säikeisiin. Jokaisen sekvensointisyklin aikana nukleinihappoketjuun lisätään yksi dNTP. dNTP-leimaa käytetään polymerisaation terminaattorina. Jokaisen dNTP-lisäyksen jälkeen fluoresoiva väriaine kuvannetaan emäksen tunnistamiseksi, minkä jälkeen se pilkotaan, jotta seuraava nukleotidi voidaan lisätä. Neljä palautuvaa terminaattorisidottua dNTP:tä (A, G, T ja C) ovat läsnä yksittäisinä, erillisinä molekyyleinä. Tämän vuoksi luonnollinen kilpailu minimoi lisäyksen vinoumaa. Ensisijaisen analyysin aikana emästunnistukset tehdään suoraan signaalin voimakkuusmittauksista kunkin sekvensointisyklin yhteydessä, jolloin seurauksena on sekvensointi emäs emäkseltä. Kullekin emäksen tunnistukselle määritetään laatupisteet.
- **Toissijainen analyysi** – TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli sijaitsee DRAGEN-palvelin - palvelimella parina NextSeq 550Dx -laite -laitteen kanssa TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -ajon määrittämisen ja sekvensointitulosten toissijaisen analyysin suorittamisen helpottamiseksi. TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli-analyysiin sisältyy ajon käsittelyn ja laaduntarkistuksen validointi, jota seuraa demultipleksointi, FASTQ-tiedostojen luonti, kohdistus ja varianttien tunnistus. Demultipleksointi erottaa poolatut kirjastot sellaisten ainutkertaisten sekvenssi-indeksien perusteella, jotka lisättiin kirjaston valmistelutoimenpiteen aikana. Ohjelmisto luo FASTQ-välitiedostot, jotka sisältävät kunkin näytteen sekvensointireadeja ja laatupisteytykset ottamatta lukuun readeja klustereista, jotka eivät läpäisseet suodatinta. Sen jälkeen sekvensointireadit kohdistetaan referenssigenomiin, jotta voidaan tunnistaa sekvenssien välinen suhde ja määrittää pistemäärä samankaltaisten alueiden perusteella. Kohdistetut readit kirjoitetaan tiedostoihin BAM-muodossa. Määrityksen ohjelmisto käyttää erillisiä algoritmeja BRCA1:n ja BRCA2:n pienten DNA-varianttien, BRCA1:n ja BRCA2:n suurten uudelleenjärjestymien ja GIS:n tunnistukseen. Analyysiohjelmiston moduuli luo useita tuotoksia, muun muassa sekvensoinnin mittaustiedot ja varianttien tunnistusmuototiedostot (VCF). VCF-tiedostot sisältävät tietoa viitegenomin tietyistä asemista löytyneistä varianteista. Sekvensoinnin mittaustiedot ja yksittäiset tuotostiedostot luodaan kullekin näytteelle.
- **Tertiaarinen analyysi** – TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -ohjelmiston suorittama tertiaarinen analyysi koostuu CDx-tunnistuksesta ja tulosraportin luomisesta. Tulkitut varianttitulokset esitetään yhteenvetona TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-tulosraportissa. Katso toissijaisen ja tertiäärin analyysin lisätietoja kohdasta *illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkulkuopas (asiakirjan numero 200080937)*.

Menetelmän rajoitukset

Vain *in vitro* -diagnostiseen käyttöön.

- Käytettäväksi vain lääkärin määräyksestä. Testin saa määrätä vain pätevä lääketieteen ammattilainen kliinisten laboratoriomääräysten mukaisesti.

- Potilaan hoitoa koskevien päätösten täytyy perustua hoitavan lääkärin riippumattomaan lääkinälliseen harkintaan, jossa otetaan huomioon kaikki potilaan tilaa koskevat sovellettavat tiedot, kuten potilaan ja potilaan suvun historia, lääkärintarkastukset, muista diagnostiikkatesteistä saadut tiedot sekä potilaan mieltymykset kyseisen yhteisön hoitostandardien mukaan.
- FFPE-näytelaadussa esiintyy runsaasti vaihtelua. Laadua voivat heikentää seuraavat seikat.
 - Näytteet, joita ei ole kiinnitetty vakiotyyppisillä fiksaatiotoimenpiteillä, eivät ehkä tuota uutettuja nukleiinihappoja, jotka vastaavat määrityksen laadunvarmistusvaatimuksia ([Laadunvalvonta sivulla 66](#)).
 - Somaattisia ajajamutaatioita ei välttämättä havaita luotettavasti, jos kasvainsisältö (alueittain) on alle 20 %.
 - GIS ei ehkä ole luotettava, jos kasvaimen sisältö (alueittain) on alle 33 %.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen suorituskykyä ei ole arvioitu sellaisilta potilailta saatujen näytteiden kohdalla, joille on tehty elin- tai kudossiirto.
- Kontaminaation havaitsemiseen voi kohdistua seuraavia vaikutuksia.
 - Pitkälle uudelleenjärjestäytyneiden genomien kohdalla, joissa on deleetioita ja heterotsygotian menetystä, TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -ohjelmisto voi virheellisesti luokitella DNA-näytteen kontaminoituneeksi (CONTAMINATION_SCORE > 1 457).
 - Toimenpiteen aikainen kontaminaatio voi johtua aiempien näytteenkäsittelyvaiheiden nukleiinihaposta. Hyvä laboratoriokäytäntö ja kaikkien tämän pakkausselosteen varotoimien ja ohjeiden noudattaminen auttavat välttämään näytteiden välistä ristikontaminaatiota.
- Negatiivinen tulos ei sulje pois mutaation läsnäoloa määrityksen havaitsemisrajan (LoD) alapuolella. Alleelitiheyksien muutoksia, jotka ovat alle määritetyn LoD:n, ei ehkä havaita yhdenmukaisesti.
- Pienten DNA-varianttien tunnistuksen herkkyyteen saattavat vaikuttaa seuraavat tekijät:
 - Alhaisen kompleksisuuden genomisen konteksti.
 - Variantin kasvava pituus.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) on validoitu enintään 19 bp:n pituisten BRCA-insertioiden ja -deleetioiden ja BRCA:n suurten uudelleenjärjestymien (eksonitaso tai suurempi) havaitsemiseen. Määritys ei ehkä havaitse yli 19 bp:n pituisia variantteja tai subeksonisia muutoksia ja tapahtumia. Ne voivat kuitenkin vaikuttaa HRD-tilaan. Asianmukaisia kliinisiä-patologisia ja laboratoriokorrelaatioita suositellaan.
- Eksonitason deleetiot ovat ainoita suuria uudelleenjärjestymiä, jotka TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) raportoii. Määritys ei raportoii eksonitason insertioita.

Tuotteen osat

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -testi koostuu seuraavista komponenteista:

- TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) -pakkaus (Illumina-luettelonumero 20140799) – Pakkaus sisältää reagensseja, joiden määrä riittää 24 DNA-kirjaston luomiseen. Potilasnäytteet ja kontrollit sisältyvät tähän määrään. Pakkaus sisältää koetinsarjan, jota käytetään BRCA-mutaatioiden havaitsemisessa. Kontrollit myydään erikseen (katso [Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit sivulla 12](#)).

**HUOMIO**

RNA-kirjaston valmistelureagenssit toimitetaan TSO Comprehensive (DRAGEN) -pakkauksen mukana, mutta niitä ei tarvita TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyyn.

- TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) -pakkaus (Illumina-luettelonumero 20134650) – Pakkaus sisältää reagensseja, joiden määrä riittää 24:n DNA-kirjaston rikastamiseen. Potilasnäytteet ja kontrollit sisältyvät tähän määrään. Pakkaus sisältää GIS-määrittelyyn käytettävän koetinsarjan.
- Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli (Illumina-luettelonumero 20132935), joka sisältää seuraavat komponentit:
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Claims -paketit
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -ohjelmistopaketti
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -USB-pakkaus.

Illumina-huoltoedustaja asentaa sopivan TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli-version ja hakee Claims-paketin DRAGEN-palvelin-palvelimelta NextSeq 550Dx -laite -laitetta varten. Asiakirjassa *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkulkuopas* (asiakirjan numero 200080937) on lisätietoja analyysimoduulista.

Reagenssit

Mukana tulevat reagenssit

Illumina tarjoaa seuraavat reagenssit.

TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) -pakkaus (Illumina-tuotenro 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (pakastin), osanro 20031118

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää T4-DNA polymerase -polymeraasia ja polynukleotidikinaasia	-25 °C – -15 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 °C – -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää ligaasia	-25 °C – -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yleiskäyttöisiä sekvensointioligonukleotideja	-25 °C – -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yleiskäyttöisiä sekvensointioligonukleotideja	-25 °C – -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 °C – -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA polymerasea ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C

* Reagenssi toimitetaan, mutta TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ei edellytä sitä.

TruSight Oncology Comp Library Prep (jääkaappi), osanro 20031119

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vesiliuos, joka sisältää magneettihelmiä	2 °C – 8 °C
TE Buffer (TEB)	20031443	1	10 ml	Tris-EDTA-liuos	2 °C – 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, osanumero 20031120

Aktiiviset ainesosat: puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yksittäin barcode-leimattuja oligonukleotidialukkeita.



HUOMIO

Älä yhdistä CPxx- ja UPxx-indeksialukkeita samaan kirjastoon.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, osanumero 20031126

Aktiiviset ainesosat: puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yksittäin barcode-leimattuja oligonukleotidialukkeita.



HUOMIO

Älä yhdistä CPxx- ja UPxx-indeksialukkeita samaan kirjastoon.

Indeksialuke	Osanumero	Määrä	Tilavuus	i7-indeksi	Sekvenssi	i5-indeksi	Sekvenssi	Säilytyslämpötila
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCTCTG	-25 °C – -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCTCTG	-25 °C – -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCTCTG	-25 °C – -15 °C

Indeksialuke	Osanumero	Määrä	Tilavuus	i7-indeksi	Sekvenssi	i5-indeksi	Sekvenssi	Säilytyslämpötila
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C – -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (jääkaappi), osanro 20031123

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää formamidia ja suoloja	2 °C – 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja kiinteän faasin paramagneettisia helmiä, jotka on kovalettisesti pinnoitettu streptavidiinilla	2 °C – 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroksidiliuos	2 °C – 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Puskuroitu vesiliuos	2 °C – 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää kiinteän faasin paramagneettisia helmiä	2 °C – 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptotetanolia ja formamidia	2 °C – 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vesiliuos, joka sisältää magneettihelmiä	2 °C – 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (pakastin), osanro 20031121

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää oligonukleotideja	-25 °C – -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 °C – -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää detergenttiä	-25 °C – -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA polymerase - polymeraasia ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää P5- ja P7-alukkeita	-25 °C – -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptotoetanolia ja formamidia	-25 °C – -15 °C
PhiX (PX3 tai PhiX)	20031492	1	10 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää PhiX-genomi-DNA:ta	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, osanro 20031122

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidikoetinpooli	-25 °C – -15 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidikoetinpooli	-25 °C – -15 °C

* Reagenssi toimitetaan, mutta TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ei edellytä sitä.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, osanro 20031127

Seuraavat reagenssit toimitetaan, mutta TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ei edellytä niitä.

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, DNA polymerase - polymeraasia, RNAaasi H:ta ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja satunnaisia heksameerejä	-25 °C – -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää reverse transcriptase - entsyymiä	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) -pakkaus (Illumina-tuotenro 20134650)

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (jääkaappi), osanro 20140116

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää formamidia ja suoloja	2 °C – 8 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja kiinteän faasin paramagneettisia helmiä, jotka on kovalettisesti pinnoitettu streptavidiinilla	2 °C – 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Natriumhydroksidiliuos	2 °C – 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Puskuroitu vesiliuos	2 °C – 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää kiinteän faasin paramagneettisia helmiä	2 °C – 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNB1)	20031482	1	4,8 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptotetanolia ja formamidia	2 °C – 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Vesiliuos, joka sisältää magneettihelmiä	2 °C – 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (pakastin), osanro 20140115

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää oligonukleotideja	-25 °C – -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 °C – -15 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää detergenttiä	-25 °C – -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	1	550 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA polymerase - polymeraasia ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää P5- ja P7-alukkeita	-25 °C – -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptoetanolia ja formamidia	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, osanro 20140117

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Oligonukleotidikoetinpooli	-25 °C – -15 °C

Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

Monistusta edeltävät reagenssit

- DNA-eristys- ja -puhdistusreagenssit – katso reagenssivaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 21](#).
- DNA-kvantifiointireagenssit – katso reagenssivaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 21](#).
- TruSight Oncology Controls:
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina-luettelonumero 20090155)
- Etanoli (EtOH), 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- RNase/DNase-free water

Monistuksen jälkeiset reagenssit

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 sykliä) (Illumina-luettelonumero 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykliä)
- EtOH, 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- RNase/DNase-free water

Reagenssin säilytys ja käsittely

Seuraavat reagenssilaatikat lähetetään pakastettuina. Säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C.

Laatikko	Osanumero	Laboratorioalue
TruSight Oncology Comp Library Prep (pakastin)	20031118	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp Enrichment (pakastin)	20031121	Monistuksen jälkeen
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Monistuksen jälkeen
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (pakastin)	20140115	Monistuksen jälkeen
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Monistuksen jälkeen

Seuraavat reagenssilaatikat toimitetaan geelipakkauksissa, jotta 0 °C – 10 °C:n lämpötila voidaan ylläpitää. Säilytä 2 °C – 8 °C:n lämpötilassa.

Laatikko	Osanumero	Laboratorioalue
TruSight Oncology Comp Library Prep (jääkaappi)	20031119	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp Enrichment (jääkaappi)	20031123	Monistuksen jälkeen
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (jääkaappi)	20140116	Monistuksen jälkeen



HUOMIO

Älä säilytä reagensseja automaattisen sulatusjärjestelmän omaavassa säilytysyksikössä tai jääkaapin ovilokeroissa.



HUOMIO

Älä pakasta helmiä sisältäviä reagensseja (LNB1, SPB ja SMB).

- Reagenssien fyysisen ulkoasun muutos voi olla osoitus materiaalien huononemisesta. Jos ilmenee fyysisen ulkoasun muutoksia (kuten reagenssin värin muutoksia tai sameutta), älä käytä reagensseja.
- ERA1-B- ja TCB1-reagensseissa voi olla tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Noudata kunkin reagenssin käsittelyohjeita.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen stabiilius on arvioitu ja sen suorituskyky on osoitettu enintään neljälle pakkauksen käyttökerralle. Reagenssit ovat stabiileja, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa lämpötiloissa laatikon merkinnöissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Välineet ja materiaalit

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Monistusta edeltävät välineet ja materiaalit

Välineet	Toimittaja
Ultrasonikaattori ja siihen liittyvät varusteet Katso kohta Ultrasonikaattorin määrittymiset DNA-fragmentointia varten sivulla 17.	Yleinen laboratoriotoimittaja
Vorteksointilaite	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikronäyteinkubaattorit (2) 96-kuoppaisten MIDI-levyjen (2) sisäosilla	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugi	Yleinen laboratoriotoimittaja
Levysentrifugi, jolla on seuraavat ominaisuudet: • Yhteensopiva 96-kuoppaisten mikrolevyjen kanssa • Kapasiteetti 280 × g (+/-10 %)	Yleinen laboratoriotoimittaja
Levyjen ravistin, jolla on seuraavat ominaisuudet: • 2 mm:n rata • Mahdollisuus ravistaa nopeudella 1 200 rpm ja 1 800 rpm	Yleinen laboratoriotoimittaja
Tiivistyskiila tai -tela	Yleinen laboratoriotoimittaja
Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet: • Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen • Magneetit jalustan sivuilla (ei pohjassa) • Yhteensopiva 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa	Yleinen laboratoriotoimittaja

Välineet	Toimittaja
Tarkkuuspipetit, jotka pystyvät annostelemaan tarkasti 2–1 000 µl:n tilavuudet seuraavin ohjearvoin: - Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,02 µl - Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,1 µl, 0,2 µl tai 0,5 µl - Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 1 µl tai 2 µl Pipetit on kalibroitava säännöllisesti ja niiden on oltava tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.	Yleinen laboratoriotoimittaja
Pipetointiväline	Yleinen laboratoriotoimittaja
Jää- tai kylmäblokki	Yleinen laboratoriotoimittaja
10 ml:n serologisia pipettejä	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet: - Irrotettava - Sopiva ”skirted”- tai ”semi-skirted”-tyyppisille PCR-levyille - Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja alueella -20...+100 °C - DNaasiton/RNaasiton	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 1,7 ml, nukleaasittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja
Nukleaasittomat reagenssisäiliöt (kertakäyttöinen kaukalomalli, 50 ml) (tai vastaava)	Yleinen laboratoriotoimittaja
15 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
50 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
Yhteensopivat aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt)	Fisher Scientific, osanumero AB-0859 tai vastaava
96-kuoppaiset PCR -levyt, yhteensopivia PCR-laitteen kanssa, 0,2 ml (polypropeenikuopat)	Yleinen laboratoriotoimittaja

Monistuksen jälkeiset välineet ja materiaalit

Välineet	Toimittaja
NextSeq 550Dx-laite	Illumina, luettelonumero 20005715

Välineet	Toimittaja
Levysentrifugi, jolla on seuraavat ominaisuudet: • Yhteensopiva 96-kuoppaisten mikrolevyjen kanssa • Kapasiteetti 280 × g (+/-10 %)	Yleinen laboratoriotuottaja
PCR-laitte, jolla on seuraavat ominaisuudet: • Lämmitetty kansi (100 °C) • Kattaa lämpötila-alueen 4 °C – 99 °C • ±0,25 °C:n lämpötilatarkkuus • Yhteensopiva 96-kuoppaisten PCR-levyjen kanssa, 0,2 ml • Katso kohta PCR-laitteen nousunopeus sivulla 20	Yleinen laboratoriotuottaja
Vorteksointilaite	Yleinen laboratoriotuottaja
Mikronäyteinkubaattori 96-kuoppaisten MIDI-levyjen sisäosilla	Yleinen laboratoriotuottaja
Kuivalämpöblokki, jolla on seuraavat ominaisuudet: • Lämpötila-alue 25 °C – 99 °C • ±5 °C:n lämpötilatarkkuus • Varmista, että mikrosentrifugiputket ovat yhteensopivia lämpöblokin kanssa	Yleinen laboratoriotuottaja
Levyjen ravistin, jolla on seuraavat ominaisuudet: • 2 mm:n rata • Mahdollisuus ravistaa nopeudella 1 200 rpm ja 1 800 rpm	Yleinen laboratoriotuottaja
Mikrosentrifugi	Yleinen laboratoriotuottaja
Tiivistyskiila tai -tela	Yleinen laboratoriotuottaja
Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet: • Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen • Magneetit jalustan sivuilla (ei pohjassa) • Yhteensopiva 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa	Yleinen laboratoriotuottaja
Tarkkuuspipetit, jotka pystyvät annostelemaan tarkasti 2–1 000 µl:n tilavuudet seuraavin ohjearvoin: • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,02 µl • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,1 µl, 0,2 µl tai 0,5 µl • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 1 µl tai 2 µl Pipetit on kalibroitava säännöllisesti ja niiden on oltava tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipetointiväline	Yleinen laboratoriotuottaja
10 ml:n serologisia pipettejä	Yleinen laboratoriotuottaja

Välineet	Toimittaja
96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet: • Irrotettava • Sopiva ”skirted”- tai ”semi-skirted”-tyyppisille PCR-levyille • Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja alueella -20...+100 °C • DNAasiton/RNAasiton	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 2 ml, nukleaasittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 1,7 ml, nukleaasittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja
Nukleaasittomat reagenssisäiliöt (kertakäyttöinen kaukalomalli, 50 ml) (tai vastaava)	Yleinen laboratoriotoimittaja
15 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
50 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
Yhteensopivat aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt)	Fisher Scientific, osanumero AB-0859 tai vastaava
96-kuoppaiset PCR -levyt, yhteensopivia PCR-laitteen kanssa, 0,2 ml (polypropeenikuopat)	Yleinen laboratoriotoimittaja
Jää- tai kylmäblokki	Yleinen laboratoriotoimittaja

Ultrasonikaattorin määriykset DNA-fragmentointia varten

DNA:n fragmentointi eli shearing vaikuttaa määriyksen suorituskyykyyn määrittämällä fragmentin koon jakauman, mikä puolestaan vaikuttaa sekvensoinnin kattavuuteen. Useita fokusoidun ultrasonikaation asetuksia arvioitiin ja optimoitiin TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määriykselle ([Taulukko 2](#)).

- Fragmentointiaika säädettiin maksimoimaan MEDIAN_EXON_COVERAGE-mittari, josta on annettu yhteenveto kohdassa [Laadunvalvonta sivulla 66](#). Fragmentointiajat (kts. [Taulukko 2](#)) ja MEDIAN_INSERT_SIZE-tulokset olivat erilaisia eri määriyksissä.
- Kokoonpanot 1–4 ja 6 testattiin 8-lasiputkisilla liuskoilla. Kokoonpanossa 5 käytettiin yhtä lasiputkea. Putken tilavuuskapasiteetit on esitetty kohdassa [Taulukko 2](#).
- Kokoonpanojen 3–6 (pienemmät vesihaudetilavuudet) optimoinnissa käytettiin pulsointia.
- Kokoonpanot 3–5 fragmentoitiin pienemmän tilavuuden putkiin. Putken tilavuuskapasiteetit vaikuttavat fragmentointiparametreihin.

- Kokoonpano 4 (rivianturi, keskikokoinen vesihaudetilavuus, vesi, josta kaasua on poistettu) tarvitsi pitkän pulssiviiveen (40 sekuntia), jotta saavutettiin samanlainen MEDIAN_EXON_COVERAGE kuin kokoonpanoilla 1 ja 2 nimellisellä 40 ng:n syötteellä.
- Kokoonpanon 3 optimaaliset asetukset johtivat hieman suurempaan fragmenttikoon jakautumiseen muihin kokoonpanoihin verrattuna (MEDIAN_INSERT_SIZE oli noin 5–10 emäsparia suurempi).
- Kokoonpanoissa 3 ja 5 käytettiin vettä, josta ei ole poistettu kaasua, sekä pienintä vesihaudetilavuutta.
- Kokoonpanoja 3 ja 5 varten oli käytettävä suurempaa DNA-syötettä (50 ng kokoonpanossa 3, 60 ng kokoonpanossa 5), jotta saavutettiin samanlainen MEDIAN_EXON_COVERAGE verrattuna muihin neljään kokoonpanoon, joissa käytettiin nimellistä 40 ng:n syötettä.
- Kokoonpanoissa 3 ja 5 on enemmän vaurioita ja/tai denaturointia ja näin ollen vähemmän käytettävissä olevien dsDNA-molekyylien todellista massaa kirjaston valmistelua varten.

Sentrifugoi fragmentointiputket talteenotto-prosessin aikana sen takaamiseksi, että nimetty tilavuus saavutetaan, sillä kaikki materiaalin menetykset voivat heikentää suorituskkyä.

Taulukko 2 Fokusoidun ultrasonikaattorin määritykset arvioituina

Parametri	Määritys					
	1	2	3	4	5	6
Anturi	Rivi	Piste	Piste	Rivi	Piste	Rivi
Vesihautteen tilavuus	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Vesi, jonka kaasu on poistettu	Kyllä	Kyllä	Ei	Kyllä	Ei	Kyllä
Vedenjäähdytin	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Vesihautteen lämpötila	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Tulosignaalin tehohuippu (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Hyötykerroin, %	30	10	30	25	20	25
Jaksoja/purske	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsointi (10 sekunnin purskeet)	Ei	Ei	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Pulsoinnin viiveaika	Ei sovellu	Ei sovellu	10 s	40 s	10 s	10 s
Fragmentointiaika	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Näytteiden käsitteleminen	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Hauteen koko	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Lasisen 8-putkisen liuskan näytekokoo	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Yksi putki (50 µl)	130 µl (tai 96 mikroTUBE-levyä)
Värähtely	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	3 mm Y-akselin suuntaan nopeudella 20 mm/s	Ei sovellu	1,5 mm Y-akselin suuntaan nopeudella 10 mm/s
DNA-syötteen ekvivalentti (eksonikattavuuden mediaani)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ 200 sekunnin fragmentointiaika käsittää 10 sekunnin purskeita, joita toistetaan 20 kertaa.² 320 sekunnin fragmentointiaika käsittää 10 sekunnin purskeita, joita toistetaan 32 kertaa.

PCR-laitteen nousunopeus

PCR-laitteen nousunopeuden optimointia suositellaan. Esimerkiksi testattua mallia säädettiin nousunopeuden oletuksena olevasta nousunopeudesta (ja maksimiarvosta) 5 °C/s nopeuteen 3 °C/s, jotta saataisiin vertailukelpoisia tuloksia muihin malleihin, joissa on pienemmät oletusnousunopeudet.

Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen

Noudata vakiomenettelyä, kun keräät, kuljetat, varastoit ja käsittelet näytteitä.

Näytettä koskevat vaatimukset

FFPE-kudos

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määritys edellyttää 40 ng:a DNA:ta, joka on eristetty munasarjan, munanjohtimen tai primaarisen vatsakalvon FFPE-kudoksesta. Kudos on kiinnitettävä käyttämällä molekyylianalyysiin sopivaa formaliinifiksatiivia (esimerkiksi 10-prosenttinen neutraalipuskuroitu formaliini). Kudoksesta ei saa poistaa kalkkia. Ennen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen suorittamista patologin tulee tutkia kudoksenäyte varmistaakseen, että se soveltuu tähän testiin. Somaattisten ajajamutaatioiden havaitsemiseksi tarvitaan vähintään 20 %:n kasvainsisältö (alueittain). GIS:n havaitsemiseksi tarvitaan vähintään 33 %:n kasvainpitoisuus (aluetta kohden).

Jotta saadaan suuri todennäköisyys eristää 40 ng DNA:ta, suositeltu kudostilavuus on $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Tämä tilavuus vastaa kumulatiivista elinkelpoista $\geq 200 \text{ mm}^2$:n kudospinta-alaa käyttäen $5 \text{ }\mu\text{m}$:n paksuisia leikkeitä tai $\geq 100 \text{ mm}^2$ käyttäen $10 \text{ }\mu\text{m}$:n paksuisia leikkeitä. Kumulatiivinen kudospinta-ala on elinkykyisen kudosalueen summa kaikista uuttamiseen toimitetuista leikkeistä. Esimerkiksi kumulatiivinen kudospinta-ala 200 mm^2 voidaan saavuttaa uuttamalla neljä $5 \text{ }\mu\text{m}$:n leikettä, joissa on 50 mm^2 kudospinta-alaa, tai viisi $10 \text{ }\mu\text{m}$:n leikettä, joissa kussakin on 20 mm^2 kudospinta-alaa. Kudoksen nekroosi voi vähentää nukleiinihapon saantoa. Väärien negatiivisten tulosten mahdollisuuden minimoimiseksi kudos voidaan dissektoida makrotasolla nekroottisen kudoksen eliminoimiseksi ja toivottavan elinkelpoisen kasvainsisällön saavuttamiseksi.

Objektilasille preparoitua FFPE-kudosta voidaan säilyttää enintään 28 vuorokauden ajan huoneenlämmössä.

Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys

- Eristä DNA FFPE-kudoksenäytteistä käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevia uuttamispakkauksia. Uuttamispakkausten erot voivat vaikuttaa tehokkuuteen. Katso kohta [Nukleiinihapon uuttamispakkauksen arviointi sivulla 88](#).
- Säilytä uutetun nukleiinihapon kantaliuosta uuttamispakkauksen valmistajan ohjeiden mukaan.
- Säilytä uutettua DNA:ta enintään 28 vuorokauden ajan $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa.
- Jotta pitoisuus ei vaihtelisi ajan kuluessa, mittaa DNA 28 vuorokauden sisällä ennen kirjaston valmistelun aloittamista. Kvantifioi DNA käyttämällä fluorometristä kvantifiointimenetelmää, jossa hyödynnetään nukleiinihappoon sitoutuvia väriaineita. Nukleiinihapon pitoisuuden tulee olla vähintään kolmen mittauksen keskiarvo.

- Määritykseen tarvitaan 40 ng kustakin gDNA-näytteestä uuttamisen vähimmäispitoisuuden ollessa 3,33 ng/μl. Fragmentointiin tarvitaan lopullinen tilavuus 52 μl (0,77 ng/μl), jossa on vähintään 40 μl laimentimena käytettävää TEB-puskuria (kuuluu toimitukseen).

Kirjaston säilytys

Voit säilyttää kirjastoja alhaisen sitoutumisen PCR-levyillä 7–32 päivän ajan kirjastotyyppistä riippuen (katso [Taulukko 3](#)).

Taulukko 3 Kirjaston säilytysajat

Kirjaston tyyppi	Levy	Päivien lukumäärä	Säilytyslämpötila
Fragmentoitu gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C – -15 °C
Esirikastus	ALS PCR	≤ 30	-25 °C – -15 °C
Jälkirikastus	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C – -15 °C
Jälkirikastuksen PCR	PL PCR	≤ 30	-25 °C – -15 °C
Normalisoitu	NL PCR	≤ 32	-25 °C – -15 °C

Varoitukset ja varotoimet

Turvallisuus



VAROITUS

Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Ilmanvaihdon on oltava asianmukaista reagensseissa olevien vaarallisten aineiden käsittelylle. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa support.illumina.com/sds.html.

- Jotkin tämän määrityksen komponentit sisältävät formamidia eli alifaattista amidia, joka on karsinogeeni ja todennäköinen lisääntymiselle myrkyllinen aine. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne alueesi turvallisuusstandardien mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta etsimällä tuotekoodi osoitteessa support.illumina.com/sds.html. (Katso lisätietoja kohdasta [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5](#).)

- Jotkin tämän määrityksen komponentit sisältävät 2-merkaptotoetanolia, joka on pelkistävä aine. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä hyvin tuuletetulla alueella ja hävitä säiliöt ja käyttämätön sisältö sovellettavien paikallisten turvallisuusstandardien mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta etsimällä tuotekoodi osoitteessa support.illumina.com/sds.html. (Katso lisätietoja kohdasta [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5.](#))
- Jotkin tämän määrityksen komponentit sisältävät natriumhydroksidia, joka on erittäin syövyttävä emäs. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Suorita käsittely hyvien laboratoriotakäytäntöjen mukaisesti ja hävitä soveltuvien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja määräysten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta etsimällä tuotekoodi osoitteessa support.illumina.com/sds.html. (Katso lisätietoja kohdasta [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5.](#))
- Jotkin tämän määrityksen (EPM) osat sisältävät tetrametyyliammoniumkloridia, joka on akuutti myrkyllinen ihoa ärsyttävä ja meriä saastuttava aine. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Suorita käsittely hyvien laboratoriotakäytäntöjen mukaisesti ja hävitä soveltuvien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja määräysten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta etsimällä tuotekoodi osoitteessa support.illumina.com/sds.html. (Katso lisätietoja kohdasta [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5.](#))
- Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisina aineina.
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai määritysreagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja määritysreagenssien käsittelyn jälkeen.
- Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaisille viranomaisille siinä jäsenvaltiossa, missä käyttäjä ja potilas ovat.

Laboratorio

- Järjestä laboratorioon yksisuuntainen työnkulku kontaminaation estämiseksi. Monistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on oltava omat laitteet ja varusteet (esimerkiksi pipetit, pipettikärjet, vorteksilaite ja sentrifugi). Monistustuotteen tai koettimen siirtymisen estämiseksi tulee välttää palaamista monistusta edeltävälle alueelle sen jälkeen, kun olet mennyt monistuksen jälkeiselle alueelle.
- Suorita PCR-indeksoinnin ja rikastuksen vaiheet monistuksen jälkeisellä alueella monistustuotteen siirron estämiseksi.
- Kirjaston valmistelumenettelyt edellyttävät RNAasista/DNAasista-puhdasta ympäristöä. Dekontaminoi työalueet perusteellisesti RNAasia/DNAasia-estävällä puhdistusaineella. Käytä muoveja, joiden on sertifioitu olevan puhtaita DNAasista, RNAasista ja ihmisen genomi-DNA:sta.

- Puhdista monistamisen jälkeisissä toimenpiteissä työpinnat ja laitteet huolellisesti ennen jokaista toimenpidettä ja sen jälkeen juuri valmistetulla 0,5-prosenttisella natriumhypokloriittiliuoksella (NaOCl). Anna liuoksen olla kosketuksessa pintoihin 10 minuutin ajan ja pyyhi sitten perusteellisesti 70-prosenttisella etyyli- tai isopropyylialkoholilla.
- Käytä nukleaasivapaita mikrosentrifugiputkia, levyjä, pipettikärkiä ja säiliöitä.
- Käytä kalibroituja laitteita koko määrittämisessä. Varmista, että kalibroit laitteet tässä protokollassa määritettyjen nopeuksien, lämpötilojen ja määrien mukaan.
- Käytä tarkkuuspipettejä reagenssien ja näytteiden tarkan lisäämisen varmistamiseksi. Kalibroi säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Noudata seuraavia ohjeita, kun käytät monikanavaisia pipettejä:
 - Pipetoi vähintään $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Varmista, että tulppakärjet ovat hyvin paikalleen istuvia ja sopivat monikanavaisen pipetin merkille ja mallille.
 - Kiinnitä kärjet etenevällä pyörintäliikkeellä varmistaaksesi, että kaikki kärjet kiinnittyvät yhtä hyvin.
 - Aspiroi 90 asteen kulmassa niin, että kaikissa kärjissä on yhtä paljon nestettä.
 - Sekoita kaikki osat annostelun jälkeen pipetoimalla reaktioseosta ylös ja alas.
 - Tarkista annostelun jälkeen, että kaikki neste on annosteltu joka kärjestä.
- Varmista, että käytät määrittämiseen vaadittuja laitteita ja asetat ohjelmat ohjeiden mukaisesti.
- PCR-laitteen ja mikronäyteinkubaattorin ilmoitetut lämpötilat osoittavat reaktiolämpötilan, ei välttämättä laitteeseen asetettua lämpötilaa.

Määrittäminen

- Vältä ristikontaminaatiota.
 - Noudata asianmukaisia laboratoriokäytäntöjä käsitellessäsi näytteitä ja reagensseja.
 - Käytä uusia kulutustarvikkeita ja uusia pipettikärkiä näytteiden välillä ja reagenssien lisäämisen välillä.
 - Ristikontaminaatoriskin pienentämiseksi käytä aerosoliresistenttejä kärkiä.
 - Käytä yksisuuntaista työnkulkua siirryttäessä monistusta edeltäviltä monistuksen jälkeisille alueille.
 - Käsittele ja avaa vain yksi indeksialuke kerrallaan. Aseta kunkin indeksiputken korkki takaisin paikoilleen heti käytön jälkeen. Pakkauksessa on ylimääräisiä korkkeja.
 - Vaihda käsineet usein ja aina jos ne joutuvat kosketuksiin indeksialukkeiden tai näytteiden kanssa.
 - Poista käyttämättömät indeksialukeputket työalueelta.
 - Älä palauta reagensseja varastoputkiin sen jälkeen, kun niitä on käytetty putkiliuskan, kaukalon tai säiliön yhteydessä.
 - Sekoita näytteet pipetillä ja sentrifugoi levy, kun niin osoitetaan.
 - Käytä mikrolevygravistinta. Älä vorteksoi levyjä.

- Älä vaihda eri reagenssipakkauserien määrittyskomponentteja keskenään. Reagenssipakkauksen erät on merkitty reagenssipakkauksen etikettiin ja pääerän arkille.
- On noudatettava asianmukaisia laboratorionkäytäntöjä, jotta nukleasit ja PCR-tuotteet eivät kontaminoisi reagensseja, instrumentteja, näytteitä ja kirjastoja. Nukleasin ja PCR-tuotteen kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- Määrittäksen optimaalinen suorituskyky ja säilytys edellyttävät asianmukaista levytyyppiä. Muista noudattaa levynsiirto-ohjeita kohdasta [Käyttöohjeet sivulla 33](#).
- Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voivat olla virheelliset tulokset tai kirjaston laadun merkittävä heikentyminen.
- Jos kohdan [Käyttöohjeet sivulla 33](#) ohjeessa ole määritetty pysähtymispistettä, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
- Säilytä määrittäysreagenssit tai -komponentit määrittätyssä lämpötilassa merkityillä monistusta edeltävillä ja monistuksen jälkeisillä alueilla.
- Älä säilytä reagensseja automaattisen sulatusjärjestelmän omaavassa säilytysyksikössä tai jääkaapin ovilokeroissa.
- Älä pakasta helmiä sisältäviä reagensseja (LNB1, SPB ja SMB).
- Älä käytä väärin säilytettyjä reagensseja.
- Älä poikkea kullekin reagenssille määrittelyistä sekoitus- ja käsittelyohjeista. Reagenssien riittämätön sekoittaminen tai liiallinen vorteksointi voi johtaa epäonnistuneisiin näytetuloksiin.
- ERA1-B:ssä ja TCB1:ssä voi olla tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Noudata kunkin reagenssin käsittelyohjeita.
- Valmista tuoreet master mix -seokset ja hävitä jäljellä oleva määrä käytön jälkeen.
- Valmista aina tuore 80-prosenttinen etanoliliuos RNase/DNase-free water -veteen pesuvaiheita varten. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä voi vaikuttaa tuloksiin. Hävitä 80-prosenttinen etanoliliuos käytön jälkeen voimassa olevien määräysten mukaisesti.
- Siirrä määritetty eluaattimäärä. Määritettyä pienemmän eluaattimäärän siirtäminen eluointivaiheiden aikana voi vaikuttaa tuloksiin.
- Noudata seuraavia ultrasonikaattoreita koskevia ohjeita. Muista noudattaa valmistajan ohjeita.
 - Lisää gDNA ultrasonikaattorin putkeen hitaasti välttääksesi kuplien muodostumisen. Liialliset kuplat tai ilmarako fragmentointiputkessa voivat johtaa keskeneräiseksi jäävään fragmentoitumiseen.
 - Annostele ultrasonikaattorin putkiin hitaasti ja vältä roiskumista.
 - Älä työnnä pipettikärkeä ultrasonikaattorin putken pohjaan, kun poistat fragmentoitunutta DNA:ta, jotta nesteen siirtyminen ja näytteen häviäminen voidaan välttää.
- Älä pipetoi alle 2 µl:n näytemäärää.
- Älä käytä kaukaloa reagenssien lisäämiseen niitä vaiheita varten, joissa edellytetään alle 10 µl:n materiaalin lisäämistä jokaiseen näytesyvennykseen.

- Käytä ohutkärkistä pipettiä siirtäessäsi fragmentoituneita DNA-näytteitä ultrasonikaattorin putkista Library Prep (LP) -levylle.
- Käytä vain UMI-adaptoreja.
- SUA1-adaptoreja ei saa käyttää.
- Määritä kullekin kirjaston näytteelle eri indeksialukkeet, jotta jokainen kirjasto voidaan tunnistaa, kun se yhdistetään sekvensointia varten yhteen virtauskyvettiin.
- UPxx-indeksejä tai CPxx-indeksejä voidaan käyttää.
- Älä yhdistä CPxx- ja UPxx-indeksialukkeita samaan kirjastoon.
- Näytteiden ja indeksialukkeiden väliset yhteensopimattomuudet johtavat virheellisen tuloksen raportointiin positiivisen näytteen tunnistuksen menetyksen vuoksi. Lisää näytetunnukset ja määritä indeksit Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -analyysimoduulissa ennen kirjaston valmistelun aloittamista. Kirjaa näytetunnukset, indeksointi ja levyn kuoppasuunta viitteeksi kirjaston valmistelun yhteydessä.
- Sekvensoi enintään 16 DNA-kirjastoa virtauskyvettä kohti. Sekvensoi vähintään kuusi kirjastoa. Noudata ohjeita kohdassa [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 30](#).
- Kohtien [Kohteiden 1 sieppaaminen sivulla 48](#) ja [Kohteiden 2 sieppaaminen sivulla 52](#) sidontavaiheen jälkeen siirry välittömästi pesuvaiheeseen, jotta helmipelletit eivät kuivu.
- Poista pesuvaiheiden yhteydessä kaikki 80-prosenttinen etanoli kuoppien pohjasta. Etanolijäämät saattavat vaikuttaa tuloksiin.
- Jotta määrittäminen toimii parhaalla mahdollisella tavalla, noudata kohdan [Käyttöohjeet sivulla 33](#) ohjeessa ilmoitettua pesukertojen määrää.
- Kohdan [Kirjastojen normalisointi sivulla 58](#) menettelyn aikana kirjaston helmipelletti suspendoidaan perusteellisesti uudelleen, jotta virtauskyvetin klusteritiheys on yhtenäinen.
- Saman näytteen DNA-kirjastot rikastetetaan kahdella eri koetinsarjalla, mutta ne käyttävät samaa indeksia ja ne on sekvensoitava samassa virtauskyvetissä.
- Positiiviset kontrollit ja templaattia sisältämätön kontrolli (NTC) on käsiteltävä näytteen tavoin ja jaettava molemmilla koetinsarjoilla suoritettavaa rikastusta varten.

Menetelmää koskevia huomautuksia

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -työnkulku voidaan suorittaa seuraavan aikataulun mukaisesti:
 - Päivä 1: DNA-fragmentointi gDNA-näytteistä, kirjaston valmistelu ja yli yön suoritettavan (ensimmäisen) hybridisaation aloittaminen.
 - Päivä 2: Kirjastojen rikastus, rikastettujen kirjastojen normalisointi sekä kirjastojen lataus NextSeq 550Dx -laite -laitteeseen.

Mikäli TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -työnkulkua ei voida suorittaa tämän aikataulun mukaan, useita turvallisia pysähdyspisteitä määritetään kautta protokollan. Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty protokollassa, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

- DNA:sta peräisin olevat kirjastot jaetaan erillisiin kuoppiin samanaikaista rikastamista varten OPD2-koetinsarjalla ja OPD3-koetinsarjalla. Positiivisten kontrollien ja NTC-kontrollien on noudatettava samaa menettelyä.
- Käytä TruSight Oncology Comp Enrichment -komponentteja (osanro 20031123, osanro 20031121) ja OPD2:ta TruSight Oncology Comp Content Set -sarjasta (osanro 20031122). OPD2:lla rikastettuja kirjastoja kutsutaan DNA-kirjastoiksi.
- Käytä TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -komponentteja (osanro 20140116, osanro 20140115) ja OPD3:a TruSight Oncology Comp HRD Content Set -sarjasta (osanro 20140117). OPD3:lla rikastettuja kirjastoja kutsutaan DNA HRD -kirjastoiksi.
- Tilavuus on ylimitoitettu master mix -seoksen valmistelutaulukoissa sen varmistamiseksi, että tilavuus on riittävä käsiteltävien näytteiden määrää varten.
- Käytä molekyyli-laatuista vettä, jossa ei ole nukleaaseja.
- Huuhtelee reagenssin lisäämisen jälkeen kärki aspiroimalla ja annostelemalla kerran levyn asianmukaiseen kuoppaan, ellei toimenpiteessä ole muuta määritetty.
- Huoneenlämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
- Reagenssit, näytteet ja kirjastot on pidettävä kylmässä käyttöohjeiden tietyissä vaiheissa. Tämän määritelmä on jää tai vastaava.

PCR-laitteen ohjelmat

- Ohjelmoi PCR-laitteen ohjelmat monistuksen jälkeisessä laitteessa ennen protokollan käynnistämistä.
- Varmista, että PCR-levyt sopivat tiukasti paikalleen PCR-laitteessa.
- Käytä PCR-laitteen valmistajan suosittelemia levyjä.

Levyn peittäminen ja avaaminen

- Peitä aina levyt uudella levyn liimapintaisella sulkukannella. Älä käytä sulkukansia uudelleen.
- Peitä levy kiinnittämällä liimapintainen kansi tiukasti levyyn tiivistyskiilalla tai -telalla.
- Peitä aina 96 kuopan levy uudella levyn liimapintaisella sulkukannella ennen protokollan seuraavien vaiheiden suorittamista.
 - Levyn ravisteluvaiheet
 - Sentrifugointivaiheet
 - PCR-laitteet
 - Hybridisaatiot
 - Pitkäaikainen säilytys

- Varmista, että reunat ja kuopat on peitetty, jotta voidaan vähentää ristikontaminaation ja haihtumisen riskiä.
- Aseta levy tasaiselle pinnalle, ennen kuin poistat sulkukannen hitaasti.
- Jos sulkukannella tai levyn kuoppien sivuseinämällä havaitaan nestettä tai kondensoitumista, sentrifugoi ennen avaamista kiihtyvyydellä 280 x g 1 minuutin ajan.
- Käytä liimapintaisia levyn sulkukansia, jotka toimivat -20...+100 °C:n lämpötilassa ja sopivat "skirted"- tai "semi-skirted"-tyypin PCR-levyille.

Välineet

- Varmista, että laboratoriohenkilöstö tuntee kaikkien laitteiden käyttöä ja kunnossapitoa koskevat valmistajan ohjeet ennen määrittämyksen käynnistämistä.

Levyn tyyppi ja levyn siirrot

- Määrittämyksen optimaalinen suorituskyky ja säilytys edellyttävät asianmukaista levytyyppiä.
- Kun tilavuuksia siirretään levyjen välillä, siirrä määritetty tilavuus levyn kustakin kuopasta kohdelevyn vastaavaan kuoppaan.
- Monikanavapipettejä voidaan käyttää, kun siirretään näytteitä putkiliuskojen tai levyjen välillä.
- Noudata putkia ravisteltaessa seuraavia ohjeita.
 - Käytä levyjen ravisteluun levyravistinta. Älä vorteksoi levyjä.
 - Ravistele PCR-levyjä nopeudella 1 200 rpm.
 - Ravistele MIDI-levyjä nopeudella 1 800 rpm.
 - Varmista noudattamalla valmistajan ohjeita, että levyravistin pitää levyn tiukasti paikallaan.

Sentrifugointi

- Kun protokollan ohjeissa kehoitetaan sentrifugoimaan lyhyesti, sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 x g 1 minuutin ajan.
- Jos sulkukannessa tai kuopan sivuseinämällä havaitaan nestettä, sentrifugoi levyä kiihtyvyydellä 280 x g 1 minuutin ajan.

Reagenssien käsittely

- Sulje kaikki reagenssiputket uudelleen välittömästi käytön jälkeen haihtumisen rajoittamiseksi ja kontaminaation ehkäisemiseksi.
- Palauta reagenssit määritettyyn säilytyslämpötilaan, kun niitä ei enää tarvita toimenpidettä varten.
- Suorita reagenssin valmistelutoimet, jotka edeltävät kutakin toimenpideosiota kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 33](#).
- Varmista, että master mix- ja Elution Mix -seosta sekä 80-prosenttista etanolia valmistetaan tarvittava määrä käsittelemiäsi näytteitä varten.

- Master mix- ja liuostaulukoissa ilmoitetut tilavuudet ovat ylimitoitettuja. Tilavuuden ylimitoituslaskelmat tehdään seuraavasti.
 - **Taulukko 13**
 - ERA1-B-tilavuus = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,20)$.
 - ERA1-A-tilavuus = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,20)$.
 - **Taulukko 23**
 - EE2-tilavuus = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - **Taulukko 24**
 - EE2-tilavuus = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - **Taulukko 30**
 - LNA1-tilavuus = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (2,0)$.
 - LNB1-tilavuus = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (2,0)$.
 - **Taulukko 31**
 - EE2-tilavuus = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,25)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,25)$.

Adapterisarjat

- Käytä vain UMI-adaptoreja.
- SUA1-adapterit sisältyvät toimitukseen, mutta niitä ei tarvita TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyyn.

Helmien käsittely

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyyn sisältyy kolmentyyppisiä helmiä (SPB, SMB ja LNB1). Varmista, että toimenpiteen aikana käytetään oikeaa helmityyppiä.
- Tee kunkin helmityypin osalta oikea määrä pesuja.
- Varmista ennen käyttöä, että helmet ovat huoneenlämpötilassa.
- Sekoita helmiä homogeenisuuden varmistamiseksi 1 minuutin ajan ennen käyttöä.

- Noudata seuraavia ohjeita, kun sekoitat helmiä pipetillä:
 - Käytä sekoittamaasi tilavuuteen sopivaa pipettiä ja kärkikokoa.
 - Säädä tilavuusasetusta noin 50–75 %:iin näytteen tilavuudesta.
 - Pipetoi hitaasti vapauttamatta määntää.
 - Vältä roiskeita ja kuplien muodostumista.
 - Sijoita pipetti pelletin yläpuolelle ja annostele suoraan pellettiin helmien vapauttamiseksi kuopasta tai putkesta.
 - Varmista, että helmipelletti on kokonaan liuoksessa. Liuoksen pitäisi olla tummanruskeaa, ja sen koostumuksen pitäisi olla homogeenista.
 - Arvioi, onko helmipellettiä. Aspiroi varovasti kuopan koko helmiliuosta kärkeen ja katso kuoppien pohjaa.
- Jos helmet aspiroidaan pipetin kärkeen magneettisten erotusvaiheiden aikana, annostele helmet takaisin levyn kuoppaan magneettisella jalustalla. Odota, kunnes neste on kirkasta (noin 2 minuuttia), ennen kuin jatkat toimenpiteen seuraavaan vaiheeseen.
- Helmiä pestessä:
 - Käytä levyille suositeltua magneettista jalustaa.
 - Annostele nestettä suoraan helmipelletille, jotta kuoppien sivulla olevat helmet kastuvat.
 - Pidä levy magneettisella jalustalla, kunnes toimenpiteessä kehoitetaan poistamaan levy.
 - Älä ravistele levyä sen ollessa magneettisella jalustalla.
 - Älä häiritse helmipellettiä levyn ollessa magneettisella jalustalla.
- Kun helmiä pestään tai poistetaan supernatanttia, kallista pipetin kärkeä kuoppien pohjaan, jotta ei synny tyhjiötä ja jotta liuosta ei vedetä pipetin kärkien suodattimiin.

Kirjastojen määrä ja indeksien valinta

Suunnittele ennen ajon valmistelua sekvensointiajon näytekirjastojen ja näyteindeksien määrä. Seuraaviin näytemääriä koskeviin ohjeisiin sisältyvät positiiviset kontrollit, mutta ei NTC-kontrolleja. NTC:t on lisättävä suunniteltuun ajoon ylimääräisenä näytteenä.

Indeksialukkeet yksilöivät jokaisen näytteen siten, että kirjastot voidaan yhdistää toisiinsa sekvensointia varten yhdessä virtauskyvetissä. Indeksit näkyvät Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -moduulin ajon määrittämisen aikana Create Run (Luo ajo) -näytössä. Lisää indeksialuke kirjaston valmistelun yhteydessä jokaiseen näytekirjastoon. *Käytä eri indeksialukeseosta kullekin näytekirjastolle.*

Saman näytteen indeksoidut kirjastot jaetaan kahteen rikastukseen, jotka tehdään kahdella eri koetinsarjalla. Tuloksena saadut kaksi rikastettua kirjastoa jakavat saman indeksin, ja ne on sekvensoitava samassa virtauskyvetissä.

Katso kohdasta [Taulukko 4](#) tiedot vähimmäis- ja enimmäiskirjastomääristä, jotka voidaan sekvensoida yhdessä virtauskyvetissä sekvensoinnin yhteydessä.

Taulukko 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -sekvensointi

Kirjaston tyyppi	Rikastus	Minimi*	Maksimi*
DNA	OPD2	3	8
DNA HRD	OPD3	3	8

* NTC:t eivät vaikuta pleksisyyteen.

Jotta reagenssikäyttö olisi optimaalista NextSeq 550Dx -laite -laitteella sekvensoitaessa, sekvensoi 8 DNA (OPD2) -kirjastoa ja 8 DNA HRD (OPD3) -kirjastoa virtauskyvettiä kohden.

Varmista, että näytteiden kanssa käyttämäsi indeksialukkeet vastaavat indeksejä, jotka valitset Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -analyysimoduulissa. *Yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tulosraportoinnin johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä.*

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisessä on kahdentyyppisiä indeksejä (UPxx ja CPxx).

Kirjastojen vähimmäismäärää (3 DNA-kirjastoa ja 3 DNA HRD -kirjastoa) sekvensoitaessa sovelletaan seuraavia vaatimuksia:

- Älä käytä CPxx-indeksijoukkoja.
- Yksi seuraavista UPxx-indeksijoukoista tarvitaan riittävää monimuotoisuutta varten:
 - UP01, UP02 ja UP03
 - UP04, UP05 ja UP06
 - UP07, UP08 ja UP09
 - UP10, UP11 ja UP12

Esimerkiksi ensimmäisen kirjaston määrittäminen on UP01, toisen kirjaston määrittäminen on UP02 ja kolmannen kirjaston määrittäminen on UP03.

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) edellyttää, että TruSight Oncology DNA Control v2 on käytössä positiivisena kontrollina. Sisällytä TruSight Oncology DNA Control v2 jokaiseen DNA-sekvensointiajona määritellyssä kirjaston valmistelutapahtumassa. Yksilöllinen positiivinen kontrolli valmistetaan jokaiselle suunnitellulle sekvensoidulle ajolle. Katso lisätietoja kohdasta TruSight Oncology DNA Control v2 (EU) -pakkausseloste.

TruSight Oncology DNA Control v2 -syötemäärä on 2 µl.

Sisällytä NTC jokaisen kirjaston valmistelutapahtumaan. NTC sekvensoidaan toistuvasti yhden kirjaston valmistelutapahtumassa. Noudata seuraavia ohjeita positiivisen kontrollin ja NTC:n osalta:

- Valmistele kirjastot positiivisista kontrolleista ja NTC-kontrolleista samalla tavalla kuin näytteet. Positiivinen kontrolli ja NTC on jaettava kummallakin koetinsarjalla tehtävää rikastamista varten samalla tavalla kuin näytteet.

- Käytä DNA NTC:lle TE-puskuria (TEB).
- Positiiviset kontrollit sisältyvät maksimikirjastovaatimukseen.
- NTC:t eivät sisälly minimikirjastovaatimukseen.
- Käytä NTC:lle UP-indeksejä, kun olet sekvensoimassa kirjastojen vähimmäismäärää.
- Koska NTC sekvensoidaan toistuvasti, tälle kontrollille valittua indeksiä ei voi toistaa kirjaston valmistelutapahtumassa.

Seuraavissa taulukoissa on esimerkkejä levyasetteluista kirjaston valmistelutyönkulkua varten ([Kuva 1](#)). Jokainen numeroitu sarake edustaa yhtä sekvensointiajoa. NTC sekvensoidaan jokaiselle sarakkeelle tai sarakejoukolle.

Taulukko 5 Kirjaston valmistelulevy kuusi potilasnäytettä sisältävälle yksittäiselle ajolle

	1	2	3	4	5	6
A	Pos. DNA-kontrolli	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
B	DNA 1	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
C	DNA 2	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
D	DNA 3	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
E	DNA 4	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
F	DNA 5	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
G	DNA 6	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä
H	DNA:n NTC	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä

Taulukko 6 Kirjaston valmistelulevy 20 potilasnäytettä sisältävälle kolmelle ajolle

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

Käyttöohjeet

Yleiskatsaus TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-työnkulusta esitetään kohdissa [Kuva 1](#) ja [Kuva 2](#).

Kirjaston valmistelun työnkulku

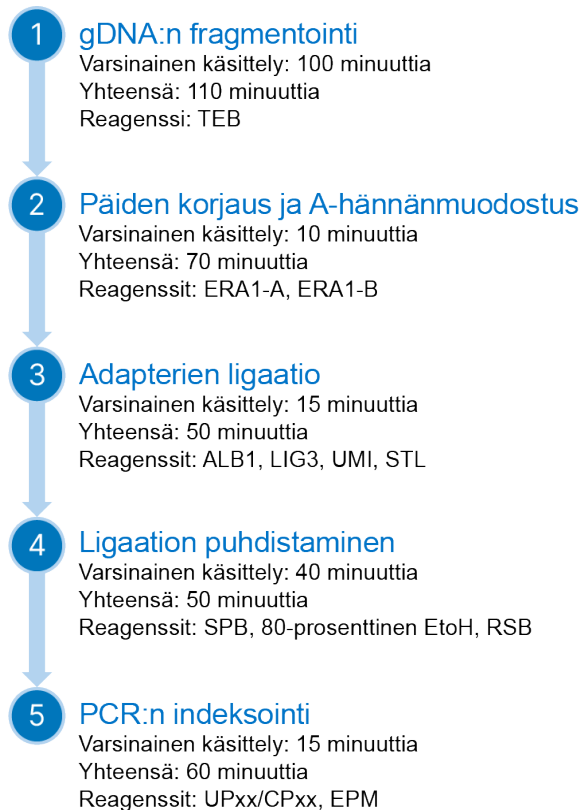
[Kuva 1](#) esittää kirjaston valmistelun työnkulun TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-määrittystä varten. Käsittele positiiviset kontrollit ja NTC-kontrollit samalla tavalla kuin näytteet. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin.

Ennen kuin aloitat protokollan, syötä ajo- ja näytetiedot Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -analyysimoduuliin. Katso *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkulkuopas (asiakirjan numero 200080937)*.

Kuva 1 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -työnkulku (osa 1)

Päivä 1

Turvallinen
pysäytyskohta



Turvallinen
pysäytyskohta

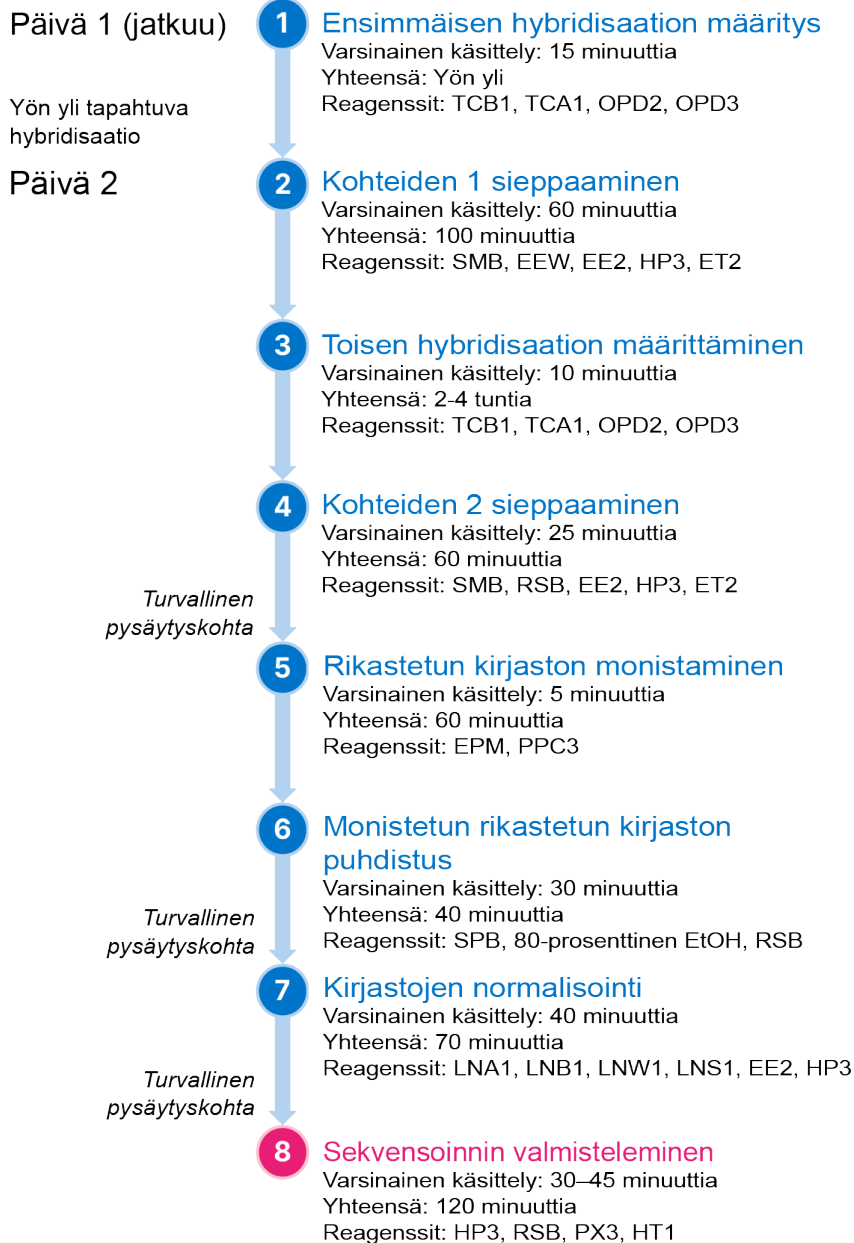
 Katkaistu DNA

* Varsinaisen käsittelyn aika ja kokonaisaika ovat likimääräisiä.

Rikastuksen työnkulku

Kuva 2 esittää rikastuksen työnkulun. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin.

Kuva 2 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -työnkulku (osa 2)



● Rikastus

● Sekvensoinnin valmistelu

PCR-laitteiden ohjelmointi

Ennen kuin aloitat määrittäksen, tallenna seuraavat ohjelmat monistuksen jälkeisille PCR-laitteille.

Taulukko 7 Monistuksen jälkeisen PRC-laitteen ohjelmat

Menetelmän vaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiivilavuus	PCR-laitteen parametrit
PCR:n indeksointi	I-PCR	100 °C	50 µl	98 °C 30 sekunnin ajan 15 sykliä: 98 °C 10 sekunnin ajan 60 °C 30 sekunnin ajan 72 °C 30 sekunnin ajan 72 °C 5 minuutin ajan - Pidä 10 °C:ssa
Suorita ensimmäinen hybridisaatio	HYB1	100 °C	50 µl	95 °C 10 minuutin ajan 85 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan 75 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan 65 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan - Pidä 57 °C:ssa 8–24 tuntia
Suorita toinen hybridisaatio	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C 10 minuutin ajan 85 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan 75 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan 65 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan - Pidä 57 °C:ssa 1,5–4 tuntia
Rikastetun kirjaston monistaminen	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C 30 sekunnin ajan 18 sykliä: 98 °C 10 sekunnin ajan 60 °C 30 sekunnin ajan 72 °C 30 sekunnin ajan 72 °C 5 minuutin ajan - Pidä 10 °C:ssa

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.



HUOMIO

Kaikki työnkulun toimenpiteet edellyttävät RNAasitonta/DNAasitonta ympäristöä.

1. Dekontaminoi työalueet perusteellisesti RNAasia/DNAasia estävällä puhdistusaineella.
2. Noudata ultrasonikaattorin asettamisessa valmistajan ohjeita.
3. Poista DNA-kontrollit säilöstä.

- Ota reagenssiputki rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

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

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
TEB	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	gDNA:n fragmentointi

gDNA:n fragmentointi

Tämä prosessi fragmentoi gDNA:n ja luo dsDNA-fragmentteja, joissa on 3'- tai 5'-ulokkeet.

Valmisteleminen

- Noudata kohdassa [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 21](#) annettuja näytteiden kvantifiointisuosituksia.
- TEB:n valmistelu — sekoita vorteksoimalla tai kääntämällä.

Toimenpide

Levyn valmisteleminen

- Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
Jos pysähdyt kohdassa [TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA sivulla 37](#), käytä PCR-levyä.
- Peitä ja aseta sivuun kohdassa [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 37](#) käyttöä varten.

gDNA:n laimentaminen

- Sulata gDNA-näytteet ja DNA-kontrollit huoneenlämpötilassa.
- Sekoita jokainen gDNA-näyte pipetoimalla 10 kertaa.
- Kerää pisarat sentrifugoimalla putki lyhyesti.
- Sekoita TEB vorteksoimalla tai kääntämällä.
- Käytä TEB:tä ja valmista näyte, jonka lopullinen tilavuus on 52 µl. Katso seuraavasta taulukosta syötemäärät ja minimipitoisuudet näytetyypin mukaan.
 - Määritys edellyttää erotuksen vähimmäispitoisuutta, jotta 52 µl:n tilavuuteen saadaan vähintään 40 µl TEB:tä.
 - Käytä DNA-kontrollia varten 2 µl lopullisessa 52 µl:n tilavuudessa.
 - Jotta näytteen menetys voidaan estää, älä pipetoi tähän laimennukseen alle 2 µl:n näytettä.

Näytteen tyyppi	Syötemäärä (ng)	Minimipitoisuus (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrolli	40	20

Fragmentointi

1. Lisää 52 µl kutakin gDNA-näytettä sonikaattorin putken erilliseen kuoppaan.



HUOMIO

Lisää gDNA putkeen hitaasti, varmistaen, että putken alaosassa ei ole ilmarakoja. Lisätietoja on kohdassa [Määrittäminen sivulla 24](#) sekä valmistajan ohjeissa.

2. Kirjaa muistiin liuskan suunta.
3. Fragmentoi gDNA fragmentteihin ultrasonikaattorilla.

Fragmentoidun DNA:n siirtäminen

1. Varmista, että kunkin näytteen näytelevyn asettelu ja indeksit vastaavat ajoa, jonka valitset analysoitavaksi TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -työkalulla.
2. Ota näyte talteen noudattamalla ultrasonikaattorin valmistajan ohjeita.
Joissakin ultrasonikaattorin putkityypeissä tarvitaan sentrifugointia, jotta näyte saadaan tiivistettyä putkessa.
3. Siirrä jokaisesta fragmentoidusta gDNA-näytteestä ohutkärkisellä pipetillä kolme kertaa 16,7 µl LP-levyn tyhjään kuoppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP-levyyn.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, kiinnitä LP PCR -levyyn liimapintainen sulkukansi ja sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan. Säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C enintään 7 vuorokautta.

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

Varmista, että monistuksen jälkeiset PCR-laitteen ohjelmat on asetettu. Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 35](#).

1. Valmistele jääastia tai vastaava.
2. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (pakastin) -pakkaus (osanro 20031118)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
ERA1-A	-25 °C – -15 °C	Pidä kylmässä.	Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus
ERA1-B	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus
ALB1	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
LIG3	-25 °C – -15 °C	Pidä kylmässä.	Adapterien ligaatio
UMI (valkoinen korkki)	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio
STL	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio
EPM	-25 °C – -15 °C	Pidä kylmässä.	PCR:n indeksointi

Taulukko 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (jääkaappi) -pakkaus (osanro 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
SPB (vaaleanvihreä merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Ligaation puhdistaminen
RSB	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Ligaation puhdistaminen

Taulukko 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers -pakkaus (osnumero 20031120)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
UPxx	-25 °C – -15 °C	Sulata asianmukaiset indeksialukeputket huoneenlämpötilaan.	PCR:n indeksointi

Taulukko 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers -pakkaus (osnumero 20031126)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
CPxx	-25 °C – -15 °C	Sulata asianmukaiset indeksialukeputket huoneenlämpötilaan.	PCR:n indeksointi

Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus

Tässä prosessissa fragmentoinnin seurauksena syntyneet ulokkeet muutetaan A-häntäulokkeelliseksi päiksi käyttämällä End Repair A-Tailing master mix (ERA1) -seosta.

Tämän seoksen eksonukleaasiaktiivisuus 3'-suunnasta 5'-suuntaan poistaa 3'-ulokkeet ja polymeraasiaktiivisuus 5'-suunnasta 3'-suuntaan täyttää 5'-ulokkeet. Tämän reaktion aikana 3'-päihin muodostetaan A-häntä, jotta estetään niiden ligaatio toisiinsa adapterin ligaatioreaktion yhteydessä.

Valmisteleminen

- Esilämmitä 2 MIDI-lämpöblokkisisäosilla varustettua mikronäyteinkubaattoria seuraavasti.
 - Esilämmitä mikronäyteinkubaattori 30 °C:n lämpötilaan.

- Esilämmitä mikronäyteinkubaattori 72 °C:n lämpötilaan.
2. Valmistelevat seuraavat reagenssit.
 - ERA1-A — sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Pidä kylmässä.
 - ERA1-B — sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
Tarkista saostumien varalta. Jos niitä näkyy, lämmitä putki 37 °C:n lämpötilaan. Sekoita sitten pipetoimalla, kunnes saostumat ovat lienneet.
 3. Valmista ERA1 Master Mix -seos mikrosentrifugiputkessa.

Taulukko 13 ERA1 Master Mix*

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

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskelmat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 28](#).

4. Sekoita pipetoimalla hitaasti 10 kertaa homogeenisuuden varmistamiseksi ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyesti. Pidä ERA1 Master Mix -seos kylmässä.
5. Valmistelevat levy valitsemalla jokin seuraavista vaihtoehtoista:
 - Jos näytteet ovat MIDI-levyssä, valmistelevat seuraavasti.
 - a. Merkitse MIDI-levyyn uudelleen merkinnällä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).
 - b. Jos jotkin näytteet ovat erillisissä MIDI-levyissä, siirrä kaikki näytteet saman MIDI-levyn erillisiin kuoppiin levyasettelun mukaan.
 - Jos levy on pakastettu, valmistelevat se seuraavasti.
 - a. Sulata LP PCR -levy huoneenlämpötilaan.
 - b. Sentrifugoi levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
 - c. Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
 - d. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).
 - e. Siirrä kunkin näytteen kaikki 50 µl LP PCR -levystä LP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
 - f. Hävitä LP PCR -levy.

Toimenpide

1. Lisää 10 µl ERA1 Master Mix -seosta kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan.
2. Hävitä jäljelle jäävä ERA1 Master Mix -seos.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
4. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
5. Inkuboi 30 °C:n lämpötilaan esilämmitetyssä mikronäyteinkubaattorissa 30 minuuttia.

- Siirrä välittömästi toiseen esilämmitettyyn mikronäyteinkubaattoriin.
- Inkuboi 72 °C:n lämpötilassa 20 minuuttia.
- Pidä LP2 MIDI -levy kylmässä 5 minuutin ajan.

Adapterien ligaatio

Tässä prosessissa liitetään adapterit gDNA-fragmenttien päihin.

Valmisteleminen



HUOMIO

Käytä vain UMI-adaptoreja. SUA1-adapterit sisältyvät toimitukseen, mutta niitä ei tarvita TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyyn.

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - ALB1 — Sekoita vähintään 10 sekuntia vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - LIG3 — Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Pidä kylmässä.
 - UMI — Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - STL — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.

Toimenpide

- Poista LP2 MIDI -levy jäistä tai vastaavasta.
- Lisää 60 µl ALB1-liuosta kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan. ALB1 on viskoosi liuos. Pipetoi hitaasti kuplien muodostumisen minimoimiseksi.
- Lisää 5 µl LIG3-reagenssia kuhunkin näytekuppaan.
- Lisää 10 µl UMI-liuosta (valkoinen korkki) kuhunkin näytekuppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 30 minuuttia.
- Sekoita STL vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- Lisää 5 µl STL-liuosta kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.

Ligaation puhdistaminen

Tässä prosessissa poistetaan ei-toivotut tuotteet ja käytetään SPB:tä adapteriin liitettyjen gDNA-fragmenttien puhdistamiseksi. Helmet pestään kahdesti tuoreella 80-prosenttisella etanolilla. Adapteriin liitetyt näytteet eluoidaan RSB:llä.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - SPB — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
 - RSB — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
2. Valmista uusi 80-prosenttinen EtOH 15 ml:n tai 50 ml:n kartioputkeen.

Taulukko 14 Valmista tuoretta 80-prosenttista etanolia

Reagenssi	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa
100-prosenttinen EtOH, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Sekoita vorteksoimalla uusi 80-prosenttinen EtOH.
4. Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

1. Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
2. Lisää välittömästi 112 µl SPB:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SPB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä ylimerkintäkertoimella 1,15. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
4. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
5. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
6. Aseta LP2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 10 minuutin ajaksi.
7. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Pidä LP2 MIDI -levy magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl uutta 80-prosenttista EtOH:ta kuhunkin näytekuoppaan.
 - b. Odota 30 sekuntia.
 - c. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet **toisen** kerran.
3. Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
4. Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH.

Eluointi

1. Irrota LP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
3. Lisää 27,5 µl RSB:tä kuhunkin näytekuoppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
6. Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
7. Aseta LP2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
8. Tee uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä LS (kirjastonäytteet).
9. Siirrä LP2 MIDI -levystä 25 µl kutakin eluaattia LS PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
10. Hävitä tyhjä LP2 MIDI -levy.

PCR:n indeksointi

Tässä vaiheessa kirjastofragmentteja monistetaan käyttämällä alukkeita, jotka lisäävät indeksisekvenssejä näytteen multipleksointiin. Aikaansaatu tuote sisältää koko kirjaston DNA-fragmentit, joiden vieressä on klusterin luontiin tarvittavat adapterit.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EPM — Pidä kylmässä.
 - UPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti.
 - CPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti.

2. Varmista, että kunkin näytteen indeksit vastaavat ajoa, joka suunniteltiin TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli -ohjelmistossa ajon asetusten aikana. Noudata indeksin valintaa koskevia ohjeita kohdassa [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 30](#).

**HUOMIO**

Näytteiden ja indeksialukkeiden yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tulosraportoinnin johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä.

Toimenpide

1. Lisää 5 µl sopivaa indeksialuketta (UPxx tai CPxx) vastaavaan näytekuoppaan LS PCR -levylle valittujen indeksien mukaisesti.

**HUOMIO**

Käsittele ja avaa vain yksi indeksialukeputki kerrallaan. Aseta kullekin indeksiputkelle uusi korkki paikoilleen heti käytön jälkeen. Älä yhdistele indeksialukkeita toisiinsa.

2. Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää 20 µl EPM:ää kuhunkin näytekuoppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LS PCR -levvyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
5. Ravista nopeudella 1 200 rpm 1 minuutin ajan.
6. Palauta monistusta edeltävät reagenssit säilytykseen.

**HUOMIO**

Suorita kaikki seuraavat vaiheet monistuksen jälkeisellä alueella monistustuotteen siirtymisen estämiseksi.

7. Sentrifugoi LS PCR -levyä nopeudella $280 \times g$ 1 minuutin ajan.
8. Aseta esiohjelmoituun monistuksen jälkeiseen PCR-laitteeseen ja aja I-PCR-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 35](#).
Jos jatkat kohtaan [Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 44](#), noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -kohdan reagensseja koskevia ohjeita.
9. Kun I-PCR-ohjelma on suoritettu, sentrifugoi LS PCR -levyä nopeudella $280 \times g$ 1 minuutin ajan.
10. Merkitse levyyn uudelleen merkintä ALS (monistetut kirjastonäytteet).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, säilytä ALS PCR -levyä lämpötilassa $-25\text{ °C} \dots -15\text{ °C}$ enintään 30 vuorokautta.

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan yön yli tapahtuvaa hybridisointia edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

1. Varmista, että monistuksen jälkeiset PCR-laitteen ohjelmat on asetettu. Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 35](#).
2. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 15 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20031123) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20140116)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
TCB1	2 °C – 8 °C	Anna lämmitä huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 16 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20031121) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20140115)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
TCA1	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

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

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
OPD2 (valkoinen korkki)	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set Box (osanro 20140117)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
OPD3 (sininen korkki)	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Tämän prosessin aikana kaksi oligo-poolia (OPD2 ja OPD3) hybridisoituvat gDNA-kirjastoihin, jotka on valmisteltu kohdassa [PCR:n indeksointi sivulla 42](#). Kohdealueiden rikastus vaatii kaksi hybridisaatiovaihetta. Ensimmäisessä hybridisaatiossa oligot hybridisoituvat gDNA-kirjastoihin yön yli (8–24 tuntia).

Valmisteleminen

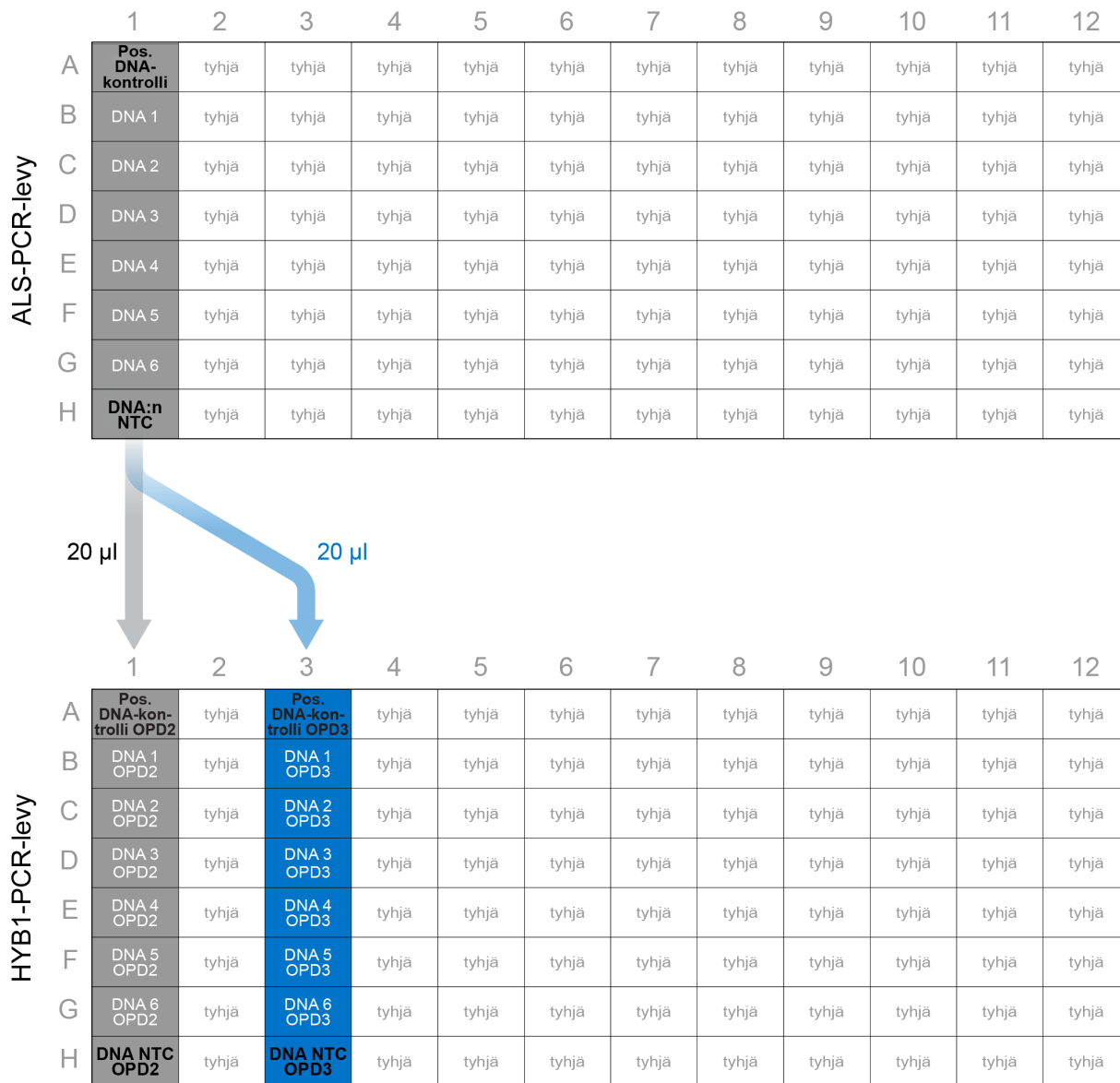
1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - TCB1 — Lämmitä putkea 37 °C:n lämpötilassa 5 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - TCA1 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPD2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPD3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

2. Jos ALS PCR -levyä on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä $280 \times g$ 1 minuutin ajan. Sekoita pipetoimalla.
3. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä HYB1 (hybridisaatio 1).

Toimenpide

1. Siirrä kustakin ALS PCR -levyn gDNA-kirjastosta 20 µl HYB1-PCR-levyn vastaavaan kuoppaan OPD2-koettimilla rikastamista varten. Sisällytä positiiviset kontrollit ja NTC-kontrollit OPD2-koettimilla rikastamista varten.
2. Siirrä ALS PCR -levyn gDNA-kirjastosta 20 µl enemmän HYB1-PCR-levyn toiseen kuoppaan OPD3-koettimilla rikastamista varten, kuten kohdassa [Kuva 3](#) näytetään. Sisällytä positiiviset kontrollit ja NTC-kontrollit OPD3-koettimilla rikastamista varten.

Kuva 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), ensimmäisen hybridisaation esimerkkilevyasettelu



3. Aseta ALS PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi ja aseta se sivuun. Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.

4. Tarkista TCB1 saostumien varalta. Jos niitä näkyy, lämmitä putki uudelleen ja vorteksoi putkea, kunnes kiteet liukenevat.
5. Lisää 15 µl TCB1-liuosta kuhunkin HYB1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
6. Lisää 10 µl TCA1-liuosta kuhunkin HYB1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
7. Lisää koettimet.
Älä yhdistä erilaisia koetintyyppisiä toisiinsa. Lisää vain yksi koetinjoukko kuoppaa kohti.
 - **[DNA-kirjastokuopat]** – Lisää 5 µl OPD2:ta (valkoinen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
 - **[DNA HRD -kirjastokuopat]** – Lisää 5 µl OPD3:a (sininen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon HRD-rikastusta varten.
8. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi HYB1 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
9. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
10. Aseta PCR-laitteeseen ja aja HYB1-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 35](#).
11. Hybridisoi 57 °C:n lämpötilassa vähintään 8 ja enintään 24 tunnin ajan.
12. Palauta hybridisaatioreagenssit säilytykseen.

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

Ota päivän 2 alussa reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 19 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20031123) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20140116)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
SMB (tummansininen merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen
ET2	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen
HP3	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen Kirjastojen normalisointi
TCB1	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
RSB	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Kohteiden 2 sieppaaminen Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus

Taulukko 20 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20031121) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20140115)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
EE2	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen Kirjastojen normalisointi
EEW	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen
TCA1	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen

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

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
OPD2 (valkoinen korkki)	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 22 TruSight Oncology Comp HRD Content Box (osanro 20140117)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
OPD3 (sininen korkki)	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen

Kohteiden 1 sieppaaminen

Tässä vaiheessa käytetään SMB:tä kohdealueille hybridisoituneiden koettimien sieppaamiseen. Helmet pestään kolme kertaa EEW:llä. Rikastetut kirjastot eluoidaan uudella EE2+HP3 Elution Mix -seoksella ja neutraloidaan ET2:lla.

Valmisteleminen

1. Esilämmitä MIDI-lämpöblokkisisäosilla varustettu mikronäyteinkubaattori 57 °C:n lämpötilaan.
2. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EEW — Sekoita vorteksoimalla 1 minuutin ajan.
 - EE2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - SMB — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan.

Varmista, että tähän toimenpiteeseen käytetään **SMB:tä**, ei SPB:tä.

- ET2 — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.

3. Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugiputkeen.

Taulukko 23 EE2+HP3 Elution Mix kohteiden 1 sieppaamiseen*

Elution Mix -komponentti	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskelmat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 28](#).

4. Vorteksoi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään vaihetta [Eluointi sivulla 50](#) varten.
5. Merkitse uusi 96 kuopan MIDI-levy merkinnällä CAP1 (sieppaus 1).
6. Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

1. Poista HYB1 PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Sentrifugoi HYB1 PCR -levyä 280 × g:ssa 1 minuutin ajan.
3. Vorteksoi SMB:tä 1 minuutin ajan helmien uudelleensuspendoimiseksi.
Jos löydät saostumia tai helmipellettejä, varmista että huoneenlämpötila saavutetaan, ja pipetoi ylös ja alas pellettien vapauttamiseksi. Vorteksoi lopuksi pellettien uudelleensuspendoimiseksi.
4. Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä jokaiseen CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,05, jotta materiaalia on riittävästi.
5. Hävitä jäljelle jäänyt materiaali sen jälkeen, kun SMB on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
6. Aseta pipetti 50 µl:aan ja siirrä kunkin kirjaston koko määrä HYB1 PCR -levyltä CAP1 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
7. Hävitä tyhjä HYB1 PCR -levy.
8. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
9. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
10. Inkuboi esilämmitetyssä mikroinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 25 minuutin ajan.
11. Aseta CAP1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
12. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

**HUOMIO**

Siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen ([Pesu sivulla 50](#)). Älä jätä helmipellettiä pitkäksi aikaa kuivaksi nesteettä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Poista CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
 - b. Lisää kuhunkin kuoppaan 200 µl EEW:tä.
 - c. Käytä pipettiä, jonka tilavuudeksi on asetettu 150 µl, ja sekoita pipetoimalla vähintään 10 kertaa.
Varmista, että kaikki helmet suspendoidaan uudelleen.
Varmista, että helmipellettejä ei ole läsnä, aspiroimalla varoen kuopan koko helmiliuos kärkeen. Tarkasta kunkin kuopan pohja silmämääräisesti. Jos helmipelletti löytyy, kallista pipetin kärkeä pellettiä kohden pesuvaiheiden aikana, jotta pelletti irtoa. Varmista, että helmipelletti on täysin upotettuna liuokseen. Liuoksen tulisi näyttää tummanruskealta ja sen koostumuksen tulisi olla homogeenistä.
 - d. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
 - e. Ravista nopeudella 1 800 rpm 4 minuutin ajan.
 - f. Inkuboi mikronäyteinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 5 minuuttia.
 - g. Aseta CAP1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
 - h. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet **toisen** kerran.
3. Pese helmet **kolmannen** kerran.
4. Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EEW-jäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

1. Poista CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää varoen 17 µl EE2+HP3 Elution Mix -seosta kuhunkin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
4. Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix.
5. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU1 (Eluointi 1).
9. Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

10. Lisää 5 µl ET2:tä kuhunkin vastaavaan uuden ELU1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
11. Siirrä varoen 15 µl eluaattia kustakin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuopasta ELU1 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
12. Hävitä tyhjä CAP1 MIDI -levy.
13. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU1 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
14. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
15. Palauta EEW säilöön.

Toisen hybridisaation määrittäminen

Tässä vaiheessa rikastettujen gDNA-kirjastojen kohdealueet sidotaan sieppauskoettimilla toisen kerran. Toisella hybridisaatiolla varmistetaan siepattujen alueiden korkea spesifisyys. Voit varmistaa kirjastojen optimaalisen rikastuksen suorittamalla toisen hybridisaatiovaiheen 57 °C:n lämpötilassa vähintään 1,5 tunnin ja enintään 4 tunnin ajan.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - TCB1 — Lämmitä putkea 37 °C:n lämpötilassa 5 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - TCA1 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPD2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPD3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Toimenpide

1. Tarkista TCB1 saostumien varalta. Jos näkyy kiteitä, lämmitä putki uudelleen ja vorteksoi, kunnes kiteet liukenevat.
2. Lisää 15 µl TCB1:tä kuhunkin ELU1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
3. Lisää 10 µl TCA1:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
4. Lisää kuhunkin kuoppaan sama koetin, jota käytettiin ensimmäisen hybridisaatiovaiheen aikana. Lisää vain yksi koetinjoukko kuoppaa kohti.
Älä yhdistä erilaisia koetintyyppejä toisiinsa.
 - **[DNA-kirjastokuopat]** – Lisää 5 µl OPD2:ta (valkoinen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
 - **[DNA HRD -kirjastokuopat]** – Lisää 5 µl OPD3:a (sininen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon HRD-rikastusta varten.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU1 PCR -levyyn.

Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.

- Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
- Laita PCR-laitteeseen ja aja HYB2-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 35](#).
- Hybridisoi 57 °C:n lämpötilassa vähintään 1,5 ja enintään 4 tunnin ajan.
- Palauta hybridisaatioreagenssit säilytykseen.

Kohteiden 2 sieppaaminen

Tässä vaiheessa käytetään SMB:tä kohdealueille hybridisoituneiden koettimien sieppaamiseen. Helmet pestään kerran RSB:llä. Rikastetut kirjastot eluoidaan uudella EE2+HP3 Elution Mix -seoksella ja neutraloidaan ET2:lla.

Valmisteleminen

- Esilämmitä MIDI-lämpöblokkisisäosilla varustettu mikronäyteinkubaattori 57 °C:n lämpötilaan.
- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EE2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - SMB — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan.
Varmista, että tähän toimenpiteeseen käytetään **SMB:tä**, ei SPB:tä.
 - RSB — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
 - ET2 — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugiputkeen.

Taulukko 24 EE2+HP3 Elution Mix kohteiden 2 sieppaamiseen*

Elution Mix -komponentti	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskelmat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 28](#).

- Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään vaihetta [Eluointi sivulla 53](#) varten.
- Merkitse uusi 96 kuopan MIDI-levy merkinnällä CAP2 (sieppaus 2).
- Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Poista ELU1 PCR -levy PCR-laitteesta.
- Sentrifugoi ELU1 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.

3. Vorteksoi SMB:tä 1 minuutin ajan helmien uudelleensuspendoimiseksi.
4. Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä jokaiseen CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,05, jotta materiaalia on riittävästi.
5. Hävitä jäljelle jäänyt materiaali sen jälkeen, kun SMB on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
6. Aseta pipetti 50 µl:aan ja siirrä kunkin kirjaston koko määrä ELU1 PCR -levyltä CAP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
7. Hävitä tyhjä ELU1 PCR -levy.
8. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
9. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
10. Inkuboi mikronäyteinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 25 minuutin ajan.
Jos jatkat vaiheeseen [Rikastetun kirjaston monistaminen sivulla 55](#), noudata osion [Valmisteleminen protokollaa varten](#) reagenssien sulatusohjeita.
11. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
12. Pidä CAP2 MIDI -levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

**HUOMIO**

Siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen ([Pesu sivulla 53](#)). Älä jätä helmipellettiä pitkäksi aikaa kuivaksi nesteettä.

Pesu

1. Poista CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
3. Lisää kuhunkin kuoppaan 200 µl RSB:tä.
4. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 4 minuutin ajan.
6. Aseta levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
7. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
8. Poista ohutkärkisellä pipetillä RSB-jäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

1. Poista CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

3. Lisää 22 µl EE2+HP3 Elution Mix -seosta kuhunkin CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
4. Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix.
5. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU2 (Eluointi 2).
9. Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
10. Lisää 5 µl ET2:tä kuhunkin vastaavaan uuden ELU2 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
11. Siirrä varoen 20 µl eluaattia kustakin CAP2 MIDI -levyn kirjastokuopasta ELU2 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
12. Hävitä tyhjä CAP2 MIDI -levy.
13. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU2 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
14. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
15. Palauta SMB, EE2, HP3, RSB ja ET2 säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, sentrifugoi ELU2 PCR -levyä kiihtyvyydellä $280 \times g$ 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa $-25...-15\text{ °C}$ enintään 7 päivän ajan.

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

1. Valmistele jääastia tai vastaava.
2. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 25 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20031121) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20140115)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
PPC3	$-25\text{ °C} - -15\text{ °C}$	Sulata huoneenlämpöön.	Rikastetun kirjaston monistaminen
EPM	$-25\text{ °C} - -15\text{ °C}$	Pidä kylmässä.	Rikastetun kirjaston monistaminen

Taulukko 26 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20031123) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20140116)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
SPB (vaaleanvihreä merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus
RSB	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus Sekvensoinnin valmisteleminen

Rikastetun kirjaston monistaminen

Rikastettujen kirjastojen monistamiseen käytetään tässä vaiheessa alukkeita.

Valmisteleminen

1. Jos ELU2-levy on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.

Toimenpide

1. Sekoita PPC3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
2. Lisää 5 µl PPC3:a jokaiseen ELU2 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
3. Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
4. Lisää 20 µl EPM:ää jokaiseen kirjastokuoppaan.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU2 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
6. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta PCR-laitteeseen ja aja EL-PCR-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 35](#).
Jos jatkat vaiheeseen [Kirjastojen normalisointi sivulla 58](#), noudata osion [Valmisteleminen protokollaa varten](#) sulatusohjeita.
8. Palauta PPC3 ja EPM säilytykseen.

Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus

Tässä vaiheessa käytetään SPB:tä rikastettujen kirjastojen puhdistamiseen ei-toivotuista reaktiokomponenteista. Helmet pestään kahdesti tuoreella 80-prosenttisellä etanolilla. Kirjastot eluoidaan RSB:llä.

Valmisteleminen

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - SPB — varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Muista käyttää toimenpiteessä *SPB:tä*, ei *SMB:tä*.
 - RSB — aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Valmista uusi 80-prosenttinen etanoli 15 ml:n tai 50 ml:n kartioputkeen.

Taulukko 27 Valmista tuoretta 80-prosenttista etanolia

Reagenssi	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
100-prosenttinen EtOH, puhdas	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Sekoita vorteksoimalla uusi 80-prosenttinen EtOH.
- Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BIND2 (sidonnan puhdistus).
- Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Poista ELU2 PCR -levy PCR-laitteesta.
- Sentrifugoi ELU2 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
- Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- Lisää välittömästi 110 µl SPB:tä kuhunkin BIND2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SPB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä ylimitoituskertoimella 1,15. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
- Siirrä kustakin ELU2 PCR -levyn kirjastosta 50 µl BIND2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Hävitä tyhjä ELU2 PCR -levy.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Aseta BIND2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 5 minuutin ajaksi.
- Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Pidä BIND2 MIDI -levy magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl tuoretta 80-prosenttista EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
 - b. Odota 30 sekuntia.
 - c. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet **toisen** kerran.
3. Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
4. Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH.

Eluointi

1. Irrota BIND2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB vorteksoimalla tai kääntämällä.
3. Lisää 32 µl RSB:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
6. Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä PL (puhdistetut kirjastot).
9. Siirrä BIND2 MIDI -levystä 30 µl kutakin eluaattia PL PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
10. Hävitä tyhjä BIND2 MIDI -levy.
11. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi PL PCR -levyyn.
12. Palauta SPB ja RSB säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, sentrifugoi PL PCR -levyä nopeudella 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa -25 °C...-15 °C enintään 30 vuorokautta.

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

1. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 28 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20031121) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20140115)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
LNA1	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi
EE2	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi

Taulukko 29 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20031123) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20140116)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
LNB1	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Kirjastojen normalisointi
HP3	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi Sekvensoinnin valmisteleminen
LNW1	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi
LNS1	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi

- Jos jatkat samana päivänä kohdasta [Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62](#), noudata Valmisteleminen protokollaa varten -osion sulatusohjeita.

Kirjastojen normalisointi

Tämä prosessi käyttää LNB1:tä sekä lisäaineita (LNA1) kunkin kirjaston määrän normalisoimiseksi, jotta kirjaston edustus olisi tasaisempi poolatuissa kirjastoissa. Helmet pestään kahdesti LNW1:llä. Kirjastot eluoidaan uudella EE2+HP3 Elution Mix -seoksella ja neutraloidaan LNS1:llä.

Valmisteleminen

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - LNB1 — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
 - LNA1 — Sekoita vorteksoimalla.
 - EE2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - LNW1 — Sekoita vorteksoimalla. Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
 - LNS1 — Sekoita vorteksoimalla. Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Suspendoi helmet uudelleen pulssivorteksoimalla LNB1:tä 1 minuutin ajan.

Kääntelee LNB1-putkea ja varmista, että kaikki helmet ovat suspendoituneet uudelleen.

3. Toista pulssivorteksointia 1 minuutin ajan, jos pellettiä havaitaan.
4. Pipetoi LNB1:tä ylös ja alas 10 kertaa pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 800 µl, uudelleensuspension varmistamiseksi.
5. Valmista välittömästi uusi LNA1+LNB1 Master Mix -seos kartioputkeen.



HUOMIO

Suspendoi kokonaan uudelleen LNB1-putken pohjalla oleva helmipelletti, jotta epäyhdenmukainen klusteritiheys voidaan estää.

Taulukko 30 LNA1 + LNB1 Master Mix* -seos

Master Mix -komponentti	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
LNA1	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskelmat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 28](#).

6. Vorteksoi LNA1 + LNB1 Master Mix -seos. Siirrä syrjään vaihetta [Sidonta sivulla 59](#) varten.
7. Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugiputkeen.

Taulukko 31 EE2 + HP3 Elution Mix -seos kirjastojen normalisoimiseen*

Elution Mix -komponentti	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskelmat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 28](#).

8. Vorteksoi uusi Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään vaihetta [Eluointi sivulla 60](#) varten.
9. Jos PL PCR -levyä on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan. Sekoita pipetoimalla.
10. Tee uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BBN (helmipohjainen normalisointi).
11. Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

1. Vorteksoi LNA1 + LNB1 Master Mix -seos.
2. Lisää välittömästi 45 µl LNA1+LNB1 Master Mix -seosta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
3. Hävitä jäljelle jäävä LNA1+LNB1 Master Mix -seos.
4. Lisää kustakin PL PCR -levyn kirjastosta 20 µl BBN MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.

Sulje reunat ja kuopat kokonaan.

6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 30 minuutin ajan.
7. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi PL PCR -levyyn ja palauta säilytykseen.
8. Aseta BBN MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
9. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
 - b. Lisää 45 µl LNW1:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
 - c. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
 - d. Ravista nopeudella 1 800 rpm 5 minuutin ajan.
 - e. Aseta BBN MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
 - f. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet *toisen* kerran.
3. Poista ohutkärkisellä pipetillä supernatanttijäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

1. Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää 32 µl EE2+HP3-liuosta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
4. Hävitä jäljelle jäänyt Elution Mix -seos.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Tee uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä NL (normalisoidut kirjastot).
9. Siirrä varovasti BBN MIDI -levyn kustakin kirjastokuopasta 30 µl eluaattia NL PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.



HUOMIO

Jos helmet ovat aspiroituneet pipetin kärkiin, jaa helmet takaisin magneettisessa jalustassa olevaan levyyn ja odota, kunnes neste on kirkasta (~2 minuuttia). Jatka vasta tämän jälkeen toimenpiteen seuraavaan vaiheeseen.

10. Hävitä tyhjä BBN MIDI -levy.
11. Sekoita LNS1 vorteksoimalla.
12. Lisää 30 µl LNS1:tä kuhunkin NL PCR -levyn kirjastokuoppaan.
13. Sekoita pipetoimalla viisi kertaa.
14. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
15. Palauta LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ja LNS1 säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, sentrifugoi NL PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 32 päivän ajan.

Valmisteleminen protokollaa varten

Valmisteluja tarvitaan sekvensointia edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

Aloita NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykliä) (PN 20028871) -sekvensointitarvikkeiden valmistelu vähintään tuntia ennen käyttöä.

1. Poista kirjaston laimennuspuskuri (HT1) -25 °C – -15 °C:n säilytyslämpötilasta. Sulata huoneenlämpöön. Pidä reagenssi viileänä sulattamisen jälkeen.
2. Nouda *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjan numero 1000000009513)* -dokumentaation valmisteluohjeita muiden pakkauksen tarvikkeiden kohdalla.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykliä)
3. Ota reagenssiputket rasiasta ja nouda sulatusohjeita.

Taulukko 32 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (pakastin) (osanro 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
PhiX Control -kontrolli	-25 °C – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön. Pidä reagenssi viileänä sulattamisen jälkeen.	Sekvensoinnin valmisteleminen

Taulukko 33 TruSight Oncology Comp Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20031123) ja TruSight Oncology Comp HRD Enrichment -pakkaus (jääkaappi) (osanro 20140116)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
HP3	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Sekvensoinnin valmisteleminen

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollan vaihe
RSB (vaaleanpunainen merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön.	Sekvensoinnin valmisteleminen

Sekvensoinnin valmisteleminen

Jokaiseen DNA-sekvensointiajoon pitäisi sisältyä positiivinen kontrolli ja NTC. NTC sekvensoidaan toistuvasti tarpeen mukaan, jotta jokaiseen ajoon sisältyy NTC. Jokaiseen ajoon sisältyy erillinen positiivinen kontrolli.

Valmisteleminen

1. Lue ohjeet [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 30](#).
2. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä dHP3 (laimennettu HP3).
3. Merkitse mikrosentrifugiputkeen dPhiX (laimennettu PhiX).
4. Esilämmitä lämpöblokki 96 °C:n lämpötilaan mikrosentrifugiputkia varten.
5. Valmistele jääastia tai vastaava.

PhiX-kontrollin laimennus ja denaturointi

1. Sekoita HP3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
2. Yhdistä seuraavat määrät dHP3-mikrosentrifugiputkessa.
 - 10 µl HP3:a
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Sekoita dHP3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
4. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
5. Sekoita PhiX-kontrolli vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Yhdistä seuraavat määrät dPhiX-mikrosentrifugiputkessa.
 - 8 µl RSB:tä
 - 2 µl PhiX -kontrollia
7. Lisää 10 µl dHP3:a dPhiX-putkeen.
8. Hävitä dHP3-putki.
9. Sekoita dPhiX-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
10. Denaturoi dPhiX inkuboimalla huoneenlämmössä 5 minuuttia.
11. Sekoita HT1 vorteksoimalla.
12. Lisää välittömästi 980 µl esijäähdytettyä HT1:tä dPhiX:ään.
13. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
14. Pidä dPhiX kylmässä, kunnes sitä käytetään toisen laimennuksen valmistamisessa.

Lopullinen pitoisuus on 20 pM dPhiX.

15. Palauta PhiX, HP3 ja RSB säilytykseen.

Kirjastojen poolaus ja denaturointi

1. Mikäli NL PCR -levy pantiin säilöön, sulata se huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sen jälkeen levyä nopeudella $280 \times g$ 1 minuutin ajan.
2. Käytä monikanavapipettiä, jonka arvoksi on asetettu 30 µl, ja sekoita varovasti NL PCR -levyn kirjastot pipetoimalla 5 kertaa.
Käytä uusia kärkiä kutakin kirjastoa varten.



HUOMIO

Sekoita kirjastot hyvin optimaalisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

3. Merkitse mikrosentrifugiputkeen PDL (poolatut DNA-kirjastot).
4. Merkitse mikrosentrifugiputkeen PHL (poolatut HRD-kirjastot).
5. Siirrä 10 µl kutakin normalisoitua OPD2-puskuriin rikastettua DNA-kirjastoa NL-levystä PDL-putkeen.
Älä poolaa kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
6. Siirrä 10 µl kutakin normalisoitua OPD3-puskuriin rikastettua DNA HRD -kirjastoa NL-levystä PHL-putkeen.
Älä poolaa kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
7. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
8. Sekoita PDL- ja PHL-putket vorteksoimalla.
9. Sentrifugoi PDL- ja PHL-putkia lyhyesti.
10. Inkuboi PDL- ja PHL-putkia lämpöblokkissa 96 °C:ssa 2 minuutin ajan.
11. Laita PDL- ja PHL-putket jäälle 5 minuutiksi.
12. Sekoita PDL- ja PHL-putket vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
13. Palauta PDL- ja PHL-putket takaisin jäälle.

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 20 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
3. Hävitä PDL-putki.
4. Lisää 5 µl PHL:ää DIL1:een.
5. Lisää 475 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).
6. Sekoita DIL1-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
7. Hävitä PHL-putki.

8. **[Vianmääritys]** Jos sekvensoinnin jälkeen havaitaan ajotason tai kirjaston systeemisiä laadunvalvonnan epäonnistumisia, jotka liittyvät helmipohjaiseen normalisointiin, siirry kohtaan [Vianmääritystyönkulku: Valmistele säädetty toinen laimennus sivulla 64](#).

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
3. Hävitä DIL1-putki.
4. Lisää 1 660 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:850).
5. Sekoita valmistettu 20 pM dPhiX vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä). Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjan numero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levy kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä -25 °C – -15 °C:n lämpötilassa enintään 32 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjan numero 1000000009513)*.

Vianmääritystyönkulku: Valmistele säädetty toinen laimennus

Käytä tätä vianmääritystyönkulkua, kun sekvensoinnin jälkeen havaitaan helmipohjaiseen normalisointiin liittyviä ajotason tai kirjaston systeemisiä laadunvalvonnan epäonnistumisia (katso lisätietoja kohdasta [Vianmääritys sivulla 69](#)). Klusteritiheyksiä, jotka ovat alueen 170–220 K/mm² ulkopuolella, ei pidä säätää, ellei niihin liity laadunvalvonnan epäonnistumista. Kun olet suorittanut *ensimmäisen laimennuksen valmisteluvaiheen*, valmiste toinen laimennos käyttämällä säädettyjä DIL1- ja HT1-tilavuuksia.

HUOMAUTUS Säädettyä toista laimennusta käytetään kirjastokohtaisen valmistelun mukaisesti. Kun suuri tai pieni klusteritiheys aiheuttaa virheellisen sekvensointiajon tai virheellisen kirjaston laadunvalvonnan, saman kirjaston valmistelun seuraavia ajoja voidaan säätää samalla klusterin tiheysarvolla. Ajot uudesta kirjaston valmistelusta noudattavat tavanomaista työnkulkua.

1. Katso [Taulukko 34](#) löytääksesi klusterin tiheysalueen (K/mm²), joka sisältää sekvensointiajossa havaitun arvon. Kirjaa ylös vastaava säädetty DIL1- (µl) ja HT1-tilavuus (µl).
Reagenssin yhdistetty tilavuus on aina 1 700 µl, joka vastaa nimellistä laimennustilavuutta.

Taulukko 34 Tilavuuden säädöt klusteritiheyden perusteella

Klusterin tiheysalue (K/mm ²)	Tilavuus DIL1 (µl)	Tilavuus 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	1 647
170–220	40	1660
221–240	31	1669
241–260	28	1672
261–280	25	1675
281–300	22	1678
≥ 300	21	1679

2. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä TDIL2 (vianmäärityslaimennus 2).
3. Siirrä DIL1:n tilavuus kohdasta [Taulukko 34](#) tyhjään TDIL2-putkeen.
4. Hävitä DIL1-putki.
5. Lisää esijäähdytetyn HT1:n tilavuus kohdasta [Taulukko 34](#) TDIL2-putkeen.
6. Sekoita valmistettu 20 pM dPhiX vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
7. Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää TDIL2-putkeen.
8. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
9. Lisää 1 300 µl TDIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjan numero 1000000009513)*.
10. Hävitä TDIL2-putki.
11. Sentrifugoi NL PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä sitten –25...–15 °C:n lämpötilassa enintään 32 vuorokautta.
12. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjan numero 1000000009513)*.

Tulosten tulkinta

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen sekvensointitulokset raportoidaan kullekin näytteelle yksittäin PDF-raportissa ja JSON-raportissa. Lisäksi näytetasolla luodaan Low Depth Report -raportti (`LowDepthReport.tsv`).

Ajotasolla luodaan seuraavat tuotostiedostot:

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

Vain laadunvalvonnan läpäisseet variantit näkyvät PDF- ja JSON-raporteissa.

Tarkat analyysitiedot ovat kohdassa *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkulkuopas (asiakirjan numero 200080937)*.

Kytkösdiagnostiikan tulokset

CDx:n käyttötarkoituksen puitteissa voidaan saada kolme mahdollista tulosta:

- **Positiivinen** – Variantti tai biomarkkeri havaitaan (CDx).
- **Ei havaittu** — Näytteessä ei havaittu CDx:n käyttöaiheeseen liittyviä variantteja tai biomarkkereita. Näytteelle valittu syöpätyyppi soveltuu CDx:lle.
- **Ei tulosta** – Variantin tai biomarkkerin tilan määrittäminen ei ole mahdollista yhdestä tai useammasta seuraavasta syystä:
 - Sekvensointiajo ei läpäissyt laadunvarmistuksen spesifikaatioita.
 - Kirjasto ei läpäissyt vaadittuja laadunvarmistuksen spesifikaatioita. Läpäistyjen laadunvalvontaluokkien osalta ei havaittu kytkösdiagnostiikan variantteja tai biomarkkereita.
 - Kirjasto ei läpäissyt vaadittuja NTC- ja positiivisten kontrollien spesifikaatioita.

Kaikki CDx:n tulokset on raportoitu kytkösdiagnostiikan tulosten osiossa JSON-raportissa. Vain positiiviset tulokset on lueteltu kytkösdiagnostiikan tulosten osiossa PDF-raportissa.

Laadunvalvonta

TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) -analyysimoduuli määrittää sekvensointiajon, kirjaston ja näytteen validiteetin automaattisesti ja raportoi sen. Katso kohdista [Taulukko 35](#) ja [Taulukko 36](#) sekvensointiajoa, kirjastoa ja kontrolleja koskevat laadunvalvontamittarit ja -määritykset. Jos positiivinen kontrolli tai NTC-kontrolli ei vastaa määrityksiä, ohjelmisto mitätöi automaattisesti potilasnäytteet kontrollinäytteen tulosten perusteella. Tarkat analyysitiedot ovat kohdassa *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkulkuopas (asiakirjan numero 200080937)*. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-raportissa, joka on saatavana PDF- ja JSON-muodoissa, on yhteenveto laadunvalvonnan

tuloksista. Raporttitiedostot ovat analyysikansiossa. Katso analyysikansion (sisältää PDF- ja JSON-raportit) ja ajokansion sijainnit kohdasta *Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkulkuopas (asiakirjan numero 200080937)*.

Virheelliset sekvensointiajot ja kirjastot on toistettava. Lisätietoja kirjastojen sekvensointiajojen tai testien toistamisesta on kohdassa [Vianmäärittäminen sivulla 69](#). Toteuta laboratorion laadunhallintajärjestelmän mukaiset laadunvalvonnan lisätoimenpiteet voimassa olevien paikallisten määräysten tai akkreditointivaatimusten mukaisesti.

Katso nukleiinihapon kvantifiointia koskevat tiedot ja materiaalin vähimmäissyöttöä koskevat vaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 21](#).

Taulukko 35 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-raportin tuloksen laadunvalvontamittarit

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
Sekvensointi-ajo	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Suodattimen (PF) läpäisevien readien prosenttiosuus.	Sekvensointiajo mitätöity. Tuloksia ei raportoida millekään ajon näytteelle.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Emäksen tunnistusten keskimääräinen prosenttiosuus laatupisteytyksen ollessa vähintään Q30 sekvenssifragmentin 1 kohdalla.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Emäksen tunnistusten keskimääräinen prosenttiosuus laatupisteytyksen ollessa vähintään Q30 sekvenssifragmentin 2 kohdalla.	

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
DNA-kirjastot	CONTAMINATION_SCORE	$\leq 1\,457$	Kontaminaatiopistemäärä, joka perustuu SNP-varianttien alleelitiheyden (VAF) jakautumiseen.	DNA-tuloksia ei raportoida.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Näytteen mediaanifragmenttipituus	BRCA:n pienten DNA-varianttien tuloksia ei raportoida.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (määrä)	≥ 150	Eksonifragmentin mediaanikattavuus kaikissa eksonin emäksissä.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Sellaisten eksoniemästen prosenttiosuus, joiden fragmenttikattavuus on 50-kertainen.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Kimeeristen sekvenssifragmenttien prosenttimäärä.	BRCA:n suurten uudelleenjärjestymisten tuloksia ei raportoida.
	GENE_SCALED_MAD (määrä)	$0 \leq x \leq 0,134$	Absoluuttisten poikkeamien mediaani kunkin CNV-kohdealueen normalisoidun lukumäärän mediaanista.	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (määrä)	$\geq 1,0$	Säilöjen raakamäärän mediaani CNV-kohdetta kohti.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	HRD-koetinten prosenttiosuus, joiden fragmenttikattavuus on 50-kertainen.	GIS-tuloksia ei raportoida.
	EXCESSIVE_TF (määrä)	≤ 0	Virhetilan mittari, joka osoittaa, onko kasvainfraktio niin suuri, että normaaleja ja kasvainsignaaleja ei voida enää erottaa GIS:n laskentaa varten.	

* Onnistuneiden tulosten kohdalla on merkintä PASS (HYVÄKSYTTY).

Taulukko 36 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-raportin tuloksen kontrollimittarit

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
DNA:n positiivinen kontrolli	Pienen DNA-variantin herkkyys	51/54 määritettyä varianttia havaittu	Ohjelmisto mitätöi automaattisesti potilasnäytteet kontrollinäytteen tulosten perusteella. BRCA:n pienten DNA-varianttien tuloksia ei raportoida.
	Geenimonistuksen herkkyys	3/3 määritettyä varianttia tunnistettu	Ohjelmisto mitätöi automaattisesti potilasnäytteet kontrollinäytteen tulosten perusteella. BRCA:n suurten uudelleenjärjestymisten tuloksia ei raportoida.
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50	Ohjelmisto mitätöi automaattisesti potilasnäytteet kontrollinäytteen tulosten perusteella. GIS-tuloksia ei raportoida.
Templaattia sisältämätön DNA-kontrolli	MEDIAN_EXON_COVERAGE	≤ 8	Ohjelmisto mitätöi automaattisesti potilasnäytteet kontrollinäytteen tulosten perusteella. BRCA:n pienten DNA-varianttien tuloksia ja BRCA:n suurten uudelleenjärjestymisten tuloksia ei raportoida.
	MEDIAN_TARGET_COVERAGE	≤ 2	Ohjelmisto mitätöi automaattisesti potilasnäytteet kontrollinäytteen tulosten perusteella. GIS-tuloksia ei raportoida.

* Onnistuneiden tulosten kohdalla on merkintä PASS (HYVÄKSYTTY).

Vianmääritys

Voit tehdä työnkulun ongelmien vianmäärityksen kohdan [Taulukko 37](#) avulla. Jos näytteen sekvensointiajo tai kirjaston valmistelu epäonnistuu kaksi kertaa, vianmäärityksen lisätoimet saattavat olla tarpeen. Ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

Ennen kuin ryhdyt suositeltuihin vianmääritystoimiin, huomioi kaksi yleistä syyluokkaa, joiden vuoksi kirjastot eivät läpäise laadunvalvontavaatimuksia (QC). Kun DNA-kirjastot eivät läpäise laadunvalvontaa, perimmäinen syy on tyypillisesti joko *näyte- tai kuoppakohtainen* tai *systeeminen* työnkulun osalta.

Näyte- tai kuoppakohtaiset virheet voivat johtua käsittelyvirheistä tai näytteen luontaisesta laadusta. Systeemiset virheet voivat syntyä käytöstä, laitteista, reagensseista tai reagenssien käsittelystä, ja ne voivat vaikuttaa useisiin eri kirjastoihin. Kun mikään kirjasto ei läpäise laadunvalvontaa, systeemiset virheet ovat todennäköisimpiä. Näytteen laadun vaihtelu voi kuitenkin johtaa systeemisiin virheisiin, jotka vaikuttavat vain kirjastojen alijoukkoon tai yhteen kirjastoon.

Analysoi seuraavat mittarit virheellisen tuloksen todennäköisen lähteen määrittämistä varten.

- Tarkasta kunkin kirjaston PF-readien kokonaismäärä (lisämittari) `MetricsOutput.tsv`-tiedostosta. Samankaltaiset arvot viittaavat systeemiseen ongelmaan, kun taas yhden tai muutaman näytteen vähäinen PF-readien määrä (ml. näytteet, jotka eivät läpäise kirjaston laadunvalvontaa) viittaa näytteen tai näytekuopan ongelmaan.
- Tarkista positiivisen DNA-kontrollin PF-readien kokonaismäärä kohdasta `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` ja vertaa mittaria aiempiin arvoihin. Tämän mittarin pieneneminen positiivisessa kontrollissa voi olla merkki systeemisestä ongelmasta.

Jos sekvensointiajo ei läpäise ajon laadunvalvontavaatimuksia, syynä on systeeminen virhe.

Taulukko 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -vianmääritys

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Sekvensointiajo ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita.	- Poolausvirhe - Laimennusvirhe - Tarvikkeiden valmisteluun liittyvät ongelmat (esim. ei sulanut riittävästi, kondensaatio/jäämät virtauskyvetissä)	Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62 .
	Helmipohjainen normalisointi: suuri klusteritiheys	Jos luettelossa olevaa virhettä epäillään, korjaa ongelma ja sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62. Jos muita luettelon virheitä ei epäillä, LNB1-reagenssiputken helmipitoisuus on voinut aiheuttaa suuren klusteritiheyden. Tämä voi johtua riittämättömästä helmien sekoittamisesta. Etsi klusteritiheysarvo <code>RunCompletionStatus.xml</code>-tiedostosta, joka on ajon kansiossa. Optimaalinen klusterin tiheysalue on 170–220 K/mm²; tätä korkeammat arvot voivat kuitenkin tuottaa ajoja, jotka läpäisevät laadunvalvontavaatimukset. Jos klusterin tiheys on optimaalisen alueen yläpuolella eikä sekvensointiajo läpäise laadunvalvontavaatimuksia, normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyn kirjastot voidaan sekvensoida uudelleen ja säätää toista laimennusta varten. Toista kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62 ja noudata vianmääritysohjeita.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Virhe raportin luonnissa tai yleinen laitevirhe (verkkovirhe, virheitä reagenssien latauksessa/purkamisessa jne.).	Ohjelmisto- tai laiteongelma.	Katso ohjeet raportin luomiseen <i>Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> -analyysimoduulin työnkulkuopas (asiakirjan numero 200080937) -oppaasta. Saat apua ottamalla yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.
DNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita.	Näytesyötettä koskevia vaatimuksia ei noudatettu.	Varmista asianmukainen näytteen syöttö ja toista kirjaston valmistelu gDNA:n fragmentointi -vaiheesta. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 21 ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 21 .
	Käyttö- tai laitevirhe määrittämisen työkulussa.	Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. - Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62. - Aloita kirjaston valmistelu työkulun alusta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 36.

Havainto	Mahdollinen syy	Suositeltu toimenpide
DNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita (jatkuu).	CONTAMINATION_SCORE-kriteerit eivät täyty.	Katso kohdasta Varoitukset ja varotoimet tietoja ristikontaminaation välttämiseksi. Tarkista levyn asettelu ja kirjaston indeksointi varmistaaksesi, että saman indeksin näytteitä ei ole sekvensoitu yhdessä. Aloita kirjastojen valmistelu työnkulun alusta asiaan liittyvien näytteiden osalta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 36. Kontaminaatio on voinut tapahtua näytteen uuttamisen aikana. Uttaminen on ehkä toistettava sen varmistamiseksi, että näytteessä ei ole kontaminaatiota.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
	Näyte voi olla liian fragmentoitunut tai siinä voi olla nukleiinihappovaurioita, jotka vaikuttavat kykyyn luoda riittävän yksilöityjä kirjastoja.	Tarkista kohta Ultrasonikaattorin määrittäminen DNA-fragmentointia varten sivulla 17 ja ultrasonikaattorin valmistajan asetukset käyttöä varten (mukaan lukien vedenkorkeus ja putkityyppi). Varmista, että näytteet lisätään määrittämiseen asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 21 ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 21 . Näytteen uusi uuttaminen ja/tai vaiheen gDNA:n fragmentointi toistaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut.
	• Poolausvirhe. • Laimennusvirhe. • PDL/PHL:n epätäydellinen lämpödenaturaatio.	Sulje pois edellä luetellut DNA:han liittyvät syyt (esim. näytteen syöttö, näytteen laatu, laitteisto). Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62 .

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
DNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita (jatkuu).	Helmipohjainen normalisointi (pieni klusteritiheys).	Jos kirjaston laadunvalvontavian muita mahdollisia syitä ei epäillä, LNB1-reagenssiputken helmipitoisuus on voinut aiheuttaa pienen klusteritiheyden riittämättömästä sekoittamisesta johtuen. Etsi ja kirjaa ylös klusteritiheysarvo <code>RunCompletionStatus.xml</code> -tiedostosta, joka on ajon kansiossa. Jos klusteritiheys on alle 170 K/mm ² ja systeemistä helmipohjaista normalisointia epäillään (ml. näyttö positiivisten kontrollien PF-readien kokonaismäärästä), sekvensoi kirjastot normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä ja noudata säädettyä toista laimennusta koskevia ohjeita. Katso Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62 ja Vianmäärittäytöskulku: Valmistele säädetty toinen laimennus sivulla 64 .
	Virhe kirjaston valmistelun työnkulussa indeksi-PCR-vaiheen aikana tai sitä ennen.	Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 36 .
	- Rikastuskoettimien virheellinen käyttö. - Virhe kirjaston valmistelun työnkulussa ensimmäisen hybridisaatiovaiheen aikana tai sen jälkeen.	Systeeminen koettimen poolivirhe (esim. koetinpoolien vaihtuminen) voi johtaa normaaleihin suodattimen kokonaisläpäisylukemiin, mutta eksonikattavuuden mediaani ei läpäise laadunvalvontaa. Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 36 .

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Positiivisen kontrollin epäonnistuminen.	Näytteen syöttöä koskevat vaatimukset eivät täyttyneet positiivisen kontrollin osalta.	Varmista, että lisäys määrittelyyn tapahtuu asianmukaisesti. Tarkista levyn asettelu ja varmista, että asianmukaiset reagenssit (koettimeet, indeksit) ovat asianmukaisissa kuopissa. Varmista, että positiivinen kontrollinäyte säilytetään etiketin ohjeiden mukaisesti. Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavasta vaiheesta alkaen riippuen siitä, missä epäily käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui, kaikkien samaa positiivista kontrollia käyttävien näytteiden kohdalla. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. - Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 62. - Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 36.
	Käyttö- tai laitevirhe määrittelyn työnkulussa.	
NTC-kontrollin epäonnistuminen.	Ristikontaminaatio tai työalueen saastuminen tapahtui.	Katso kohdasta Varoitukset ja varotoimet tietoja työalueiden dekontaminoinnista ja ristikontaminaation välttämisestä. Tarkista levyn asettelu ja kirjaston indeksointi varmistaaksesi, että saman indeksin näytteitä ei ole sekvensoitu yhdessä. Toista kirjaston valmistelu työnkulun alusta alkaen kaikille kirjastoille, joilla on yhteinen templaattia sisältämätön kontrolli.
	Kirjaston virheellinen indeksointi.	

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Positiiviset ja/tai negatiiviset kontrollit sekvensointiajossa analysoitiin muina kuin kontrollinäytteinä.	Näytetyypin virheellinen määrittäminen sekvensointiajossa määrittämisessä.	Suorita analyysi siten, että kontrollit on määritetty oikein, kuten Analysis Module -työnkuluoppaassa on neuvottu (kts. kohta <i>Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) -analyysimoduulin työnkuluoppa (asiakirjan numero 200080937)</i>).

Suorituskykyominaisuudet

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) on määrittäjä, joka mahdollistaa HRD:n arvioinnin käyttämällä munasarjasyöpää sairastavien potilaiden FFPE-kasvainkudoksenäytteistä eristettyä DNA:ta. Siinä käytetään kahta NGS-paneelia. Yhtä paneelia käytetään BRCA1- ja BRCA2-geenien haitallisten ja epäiltyjen haitallisten muutosten havaitsemiseen, mukaan lukien pienet DNA-variantit ja suuret uudelleenjärjestymät. Toista NGS-paneelia käytetään GIS:inä raportoidun genomisen epästabiiliuden mittaamiseen. BRCA-positiivisuus määritellään haitallisen tai epäillyn haitallisen muutoksen havaitsemisena joko BRCA1- tai BRCA2-geeneissä. GIS-positiivisuuden määritelmä on $GIS \geq 42$. HRD-positiivisuuden määritelmä on BRCA-positiivinen ja/tai GIS-positiivinen.

Tutkimuksiin sisällytettiin FFPE-näytteet, joissa oli spesifisiä CDx-positiivisia variantteja.

Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä, ellei muuta mainita.

Taulukko 38 sisältää eri tutkimuksissa laskettujen mittaustietojen määritelmiä.

Taulukko 38 Mittaustietojen määritelmät

Termi	Määritelmä
Positiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (PPA)	Vertailumenetelmän positiivisten tulosten prosenttiosuus, kun TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) on positiivinen.
Negatiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (NPA)	Vertailumenetelmän negatiivisten tulosten prosenttiosuus, kun TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) on negatiivinen.
Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (PPC)	Sellaisten havaintojen prosenttimäärä, jotka ovat positiivisia kohteen suhteen sellaisten havaintojen joukossa, joiden odotetaan olevan positiivisia kohteen suhteen.
Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (PNC)	Sellaisten havaintojen prosenttimäärä, jotka ovat negatiivisia kohteen suhteen sellaisten havaintojen joukossa, joiden odotetaan olevan negatiivisia kohteen suhteen.
n/N	Positiivisten tai negatiivisten havaintojen määrän (n) ja havaintojen kokonaismäärän (N) osamäärä, josta saadaan PPC tai PNC. n:n ja N:n arvot voivat olla eri tasoisia (esim. variantti tai geeni) tai ryhmäkohtaisesti yhdistettyjä (esim. SNV:t).
Keskihajonta (SD)	Tunnusluku, joka kuvaa muuttujan arvojen poikkeamaa sen keskiarvosta.

Termi	Määritelmä
Variaatiokerroin prosentteina (% CV)	Keskiarvolla jaettu keskihajonta prosentteina.

Tarkkuus

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen tarkkuus HRD:n havaitsemisessa munasarjasyöpöpotilailla osoitettiin arvioimalla HRD-tilan, GIS-tilan ja BRCA-tilan tulosten yhdenmukaisuus TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen ja validoidun NGS-pohjaisen vertailumäärityksen välillä. Tarkkuus arvioitiin suhteessa ortogonaaliseen menetelmään; PPA, NPA ja tähän liittyvä kaksipuolinen Wilsonin pistemäärän 95 %:n CI laskettiin.

175 FFPE-DNA-munasarjasyöpänäytettä testattiin TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksellä ja ortogonaalisella menetelmällä. Yhdellä näytteellä saatiin virheelliset TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-tulokset, ja toisella näytteellä saatiin virheelliset vertailumäärityksen tulokset. GIS- ja HRD-tilan arvioitavissa käytetty tietojoukko sisälsi 173 näytettä. BRCA-tilan arvioinnin tietojoukko sisälsi 169 näytettä, koska neljä lisänäytettä, joiden BRCA-variantit olivat TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen mittausalueen ulkopuolella, suljettiin pois. Kelvollisiin testituloksiin perustuvat yhtäpitävyysanalyysit esitetään kohdissa [Taulukko 39](#), [Taulukko 40](#) ja [Taulukko 41](#).

Taulukko 39 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen ja vertailumenetelmän välinen yhtäpitävyys HRD-tilan havaitsemisessa

		Vertailumenetelmän tulos		
		HRD-positiivinen	HRD-negatiivinen	Yhteensä
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen tulos	HRD-positiivinen	97	6	103
	HRD-negatiivinen	6	64	70
	Yhteensä	103	70	173
Yhtäpitävyystilastot	PPA % (n/N; 95 %:n CI)	94,2 % (97/103; 87,9 %, 97,3 %)		
	NPA % (n/N; 95 %:n CI)	91,4 % (64/70; 82,5 %, 96,0 %)		

Taulukko 40 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen ja vertailumenetelmän välinen yhtäpitävyys GIS-tilan havaitsemisessa

		Vertailumenetelmän tulos		
		GIS-positiivinen	GIS-negatiivinen	Yhteensä
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen tulos	GIS-positiivinen	95	3	98
	GIS-negatiivinen	6	69	75
	Yhteensä	101	72	173
Yhtäpitävyystilastot	PPA % (n/N; 95 %-n CI)	94,1 % (95/101; 87,6 %, 97,2 %)		
	NPA % (n/N; 95 %-n CI)	95,8 % (69/72; 88,5 %, 98,6 %)		

Taulukko 41 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen ja vertailumenetelmän välinen yhtäpitävyys BRCA-tilan havaitsemisessa

		Vertailumenetelmän tulos		
		BRCA-positiivinen	BRCA-negatiivinen	Yhteensä
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen tulos	BRCA-positiivinen	40	8	48
	BRCA-negatiivinen	2	119	121
	Yhteensä	42	127	169
Yhtäpitävyystilastot	PPA % (n/N; 95 %-n CI)	95,2 % (40/42; 84,2 %, 98,7 %)		
	NPA % (n/N; 95 %-n CI)	93,7 % (119/127; 88,1 %, 96,8 %)		

Toistettavuus

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen toistettavuus ja uusittavuus arvioitiin kolmessa ulkoisessa testauspaikassa kahden paikkakohtaisen käyttäjän toimesta kahdella ajon sisäisellä replikaatilla ja kolmella erällä kolmena ei-peräkkäisenä päivänä. Kaksi käyttäjää suoritti kussakin kolmessa testauspaikassa itsenäisesti testauksen erillisillä NextSeq 550Dx -instrumenteilla. Testaus suoritettiin 27-osaisella toistettavuuspaneelilla, joka sisälsi FFPE-munasarjakudosnäytteistä eristettyä DNA:ta tunnetuilla BRCA1- ja BRCA2-mutaatioilla ja/tai GIS:illä.

Paneelin 27 osasta 16 kohdennettiin BRCA-geenien pieniin DNA-variantteihin, mukaan lukien: SNV:t, homopolymeerialueiden variantit ≥ 5 bp, insertiot ja deleetiot < 10 bp ja insertiot ja deleetiot ≥ 10 bp. BRCA:n LR-varianttityypissä käytettiin kahta paneeliosaa BRCA:n LR-varianteille < 3 eksonia ja yhtä paneeliosaa BRCA:n LR-varianteille ≥ 3 eksonia. GIS:n osalta kolme paneeliosaa edusti korkean GIS:n (+) tilaa, kolme paneeliosaa edusti GIS:iä (-), kaksi paneeliosaa edusti matalan GIS:n (+) tilaa ja yksi paneeliosaa, joka edusti jo LR-variantteja < 3 eksonia, edusti myös yhtä matalan GIS:n (+) osaa. Kukin käyttäjä testasi kussakin testauspaikassa paneelin osat kolmen ei-peräkkäisen päivän aikana ja tuotti kuusi havaintoa kohdetta ja paneeliosaa kohden. Kaikista kolmesta testauspaikasta luotiin 36 havaintoa paneelin osaa kohti (kolme testauspaikkaa $\times$ kaksi käyttäjää/laitetta $\times$ kolme päivää $\times$ kaksi ajon sisäistä replikaattia).

Kohdennetuille paneelin osille määritettiin PPC ja PNC. Analyysit tehtiin PPC:n ja PNC:n arvioimiseksi (95 %:n luottamusvälein) yhdistämällä kuuden käyttäjän tulokset kolmessa eri testauspaikassa. Paneelin osien TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyhavainnot, joiden odotettiin olevan negatiivisia kohdevariantille, yhdistettiin kunkin kohdennetun pienen DNA-variantin ja LR-variantin osalta PNC:n laskentaa varten. GIS (-) -paneeliosien TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyhavainnot yhdistettiin GIS (-) -paneeliosien PNC:n laskentaa varten.

BRCA:n pienet DNA-variantit

Sekä korkean tason (2–3×C95) että matalan tason (1–1,5×C95) BRCA:n pienten DNA-varianttien paneeliosien PPC-arvot olivat kaikki 100 % ([Taulukko 42](#)). Myös BRCA:n pienten DNA-varianttien paneeliosien PNC-arvot olivat kaikki 100 % ([Taulukko 43](#)).

Taulukko 42 Kohdennettujen BRCA:n pienten DNA-varianttien PPC varianttitason ja -luokan mukaan

Varianttitaso	Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	VAF:n keskiarvo	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI
Korkea	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)
	Homopolymeerien variantit ≥ 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)
	Insertio tai deleetio (< 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)
	Insertio tai deleetio (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0,189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,141	100 (33/33)	(89,6, 100)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0,087	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0,087	100 (36/36)	(90,4, 100)
Matala	Homopolymeerien variantit ≥ 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)
	Insertio tai deleetio (< 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)
	Insertio tai deleetio (≥ 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)

Taulukko 43 Kohdennettujen BRCA:n pienten DNA-varianttien PNC varianttiluokan mukaan

Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	PNC (%) (n/N)	95 %:n CI
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)

Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	PNC (%) (n/N)	95 %:n CI
Homopolymeerien variantit ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	100 (566/566)	(99,3, 100)
	BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	100 (492/492)	(99,2, 100)
Insertio tai deleetio (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)
Insertio tai deleetio (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

Taulukko 44 esittää varianssikomponenttianalyysin varianssilähteen mukaan kunkin BRCA:n pienen DNA-varianttiluokan korkean ja matalan tason osalta. Keskimääräinen VAF-arvo kohdennetuissa korkean tason BRCA:n pienissä DNA-variantteissa oli 0,121–0,248 ja kohdennetuissa matalan tason BRCA:n pienissä DNA-variantteissa 0,087–0,147. Kohdennettujen BRCA:n pienten DNA-varianttien kokonais-SD vaihteli välillä 0,019 (11,4 % CV) – 0,041 (28,7 % CV) korkean tason BRCA:n pienten DNA-varianttien osalta ja välillä 0,016 (18,9 % CV) – 0,043 (30,1 % CV) matalan tason BRCA:n pienten DNA-varianttien osalta.

Taulukko 44 Kohdennettujen BRCA:n pienten DNA-varianttien VAF:ien varianssikomponenttianalyysi

Varianttitaso	Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	N	VAF:n keskiarvo	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän/laitteen SD (%CV)	Päivän SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Toistettavuuden SD (%CV)	SD yhteensä (% CV)
Korkea	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)
	Homopolymeerivariantit ≥ 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)
	Insertio tai deleetio < 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)
	Insertio tai deleetio ≥ 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)

Varianttitaso	Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	N	VAF:n keskiarvo	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän/laitteen SD (%CV)	Päivän SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Toistettavuuden SD (%CV)	SD yhteensä (% CV)
Matala	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)
	Homopolymeerivariantit ≥ 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)
	Insertio tai deleetio < 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)
	Insertio tai deleetio ≥ 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)

BRCA:n suuret uudelleenjärjestäytymisvariantit

PPC-arvot kohdennetuille BRCA:n LR:ille olivat 100 % (29/29) BRCA2:n LR:lle ≥ 3 eksonia, 97,2 % (35/36) BRCA2:n LR:lle < 3 eksonia ja 94,3 % (33/35) BRCA1:n LR:lle < 3 eksonia ([Taulukko 45](#)). PNC-arvot kohdennetuille BRCA:n LR:ille olivat 98,9 % (630/637) BRCA1:lle ja 100 % (607/607) BRCA2:lle ([Taulukko 46](#)).

Taulukko 45 PPC-arvot kohdennetuille BRCA-LR:ille varianttiluokan mukaan

Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	VAF:n keskiarvo	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI*
LR ≥ 3 eksonia	BRCA2-HÄVIÖ	0,448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 eksonia	BRCA2-HÄVIÖ	0,602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	BRCA1-HÄVIÖ	0,680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Taulukko 46 PNC-arvot kohdennetuille BRCA:n LR:ille

Kohdennettu variantti	PNC (%) (n/N)	95 %:n CI*
BRCA1-HÄVIÖ	98,9 (630/637)	(97,7, 99,5)
BRCA2-HÄVIÖ	100 (607/607)	(99,4, 100)

[Taulukko 47](#) esittää varianssikomponenttianalyysin kunkin BRCA:n LR-luokan variaatiolähteen mukaan.

Keskimääräinen VAF LR ≥ 3 -eksonivariantille oli 0,448, ja kokonais-SD oli 0,026 (5,7 % CV). Keskimääräinen VAF-arvo LR < 3 eksonivarianteille vaihteli välillä 0,602–0,680, ja kokonais-SD-arvo vaihteli välillä 0,038 (6,3 % CV) – 0,079 (11,6 % CV).

Taulukko 47 VAF:n varianssikomponenttianalyysi kohdennetuissa BRCA:n LR:issä

Varianttiluokka	Kohdennettu variantti	N	VAF:n keskiarvo	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjä /		Päivän SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Toistettavuus SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
					Laite SD (% CV)					
LR ≥ 3 eksonia	BRCA2-HÄVIÖ	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 eksonia	BRCA2-HÄVIÖ	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-HÄVIÖ	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-arvot olivat 100 % korkean GIS:n (+) paneeliosille. Matalan GIS:n (+) paneeliosien PPC-arvot olivat välillä 94,4–100 % (Taulukko 48). PNC-arvot olivat 100 % kaikissa GIS (-) -paneeliosissa (Taulukko 49).

Taulukko 48 GIS:n PPC kohdennetun GIS-tilan ja paneeliosan mukaan

Kohdennettu GIS-tila	Kohdennettu GIS	Keskimääräinen GIS	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI*
Korkea 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)
Matala 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)

Taulukko 49 PNC GIS-negatiivisille kohdennetuille paneeliosille

Kohdennettu GIS-tila	Kohdennettu GIS	Keskimääräinen GIS	PNC (%) (n/N)	95 %:n 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)

Taulukko 50 esittää komponenttien varianssianalyysin varianssin lähteen mukaan kullekin kohdennetulle korkean GIS:n (+), matalan GIS:n (+) ja GIS:n (-) paneeliosalle. Kohdennettujen GIS-paneeliosien GIS-keskiarvo oli 60,1–70,2 korkean GIS:n (+) osalta, 46,3–53,1 matalan GIS:n (+) osalta ja 18,2–23,3 GIS:n (-) osalta. Kohdennettujen GIS-paneeliosien kokonaiskeskihajonta (SD) vaihteli välillä 2,5 (3,5 % CV) – 3,2 (5,2 % CV) korkean GIS:n (+) osalta, 1,5 (2,9 % CV) – 3,8 (7,2 % CV) matalan GIS:n (+) osalta ja 2,5 (11,7 % CV) – 3,3 (14,1 % CV) GIS:n (-) osalta.

Taulukko 50 GIS:n komponenttien varianssianalyysi kohdennetuille paneeliosille

Kohdennettu GIS-tila	Kohdennettu GIS	N	Keskimääräinen GIS	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjä /		Päivän SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Toistettavuus SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
					Laite	SD				
Korkea 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)
Matala 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)

Tyhjän raja

Värien positiivisten prosenttiosuus (odotettujen negatiivisten kokonaismäärästä) arvioitiin hyvänlaatuisen viereisen FFPE-munasarjakudoksen replikaattitestauksella. Kudoksen odotettiin olevan GIS-negatiivista, eikä sen odotettu sisältävän haitallisia tai epäiltyjä haitallisia BRCA1- ja BRCA2-mutaatioita (pienet DNA-variantit ja LR:t). Seitsemän hyvänlaatuista munasarjan FFPE DNA -näytettä ajettiin duplikaattina kahden käyttäjän toimesta kolmen päivän aikana kahden reagenssierän osalta 8-pleksisessä muodossa. Näytteiden alajoukko poolattiin uudelleen ja sekvensoitiin uudelleen 3-pleksisessä muodossa värien positiivisten arvioimiseksi useilla multipleksointiasetuksilla, joita tämä laite tukee. Mahdollisia havaintoja oli yhteensä 168. Värien positiivisten tulosten prosenttiosuus laskettiin asematasolla BRCA:n pienille DNA-varianteille (noin 3 miljoonaa asemaa), geenitasolla BRCA:n LR:ille ja näytetasolla GIS:lle. Värien positiivisten tulosten prosenttiosuus varianttityypin kohden on esitetty kohdassa [Taulukko 51](#).

Taulukko 51 Väärät positiiviset varianttityypin mukaan

Varianttityyppi	Väärät positiiviset*
BRCA:n pienet DNA-variantit	0 % (0/3 076 657)
BRCA LR	0 % (0/384)
GIS	0 % (0/192)

* Nimittäjät ovat 8-pleksisten ja 3-pleksisten ajojen kokonaissummat.

Määrityksen havaitsemisraja

BRCA:n pienten DNA-varianttien (SNV:t, insertiot tai deletiot ≥ 10 bp, insertiot tai deletiot < 10 bp, homopolymeerialueiden variantit ≥ 5 bp), BRCA LR:n < 3 eksonia ja ≥ 3 eksonia ja GIS:n määrityksen havaitsemisraja (LoD) määritettiin syövän FFPE-DNA-näytteistä. LoD on alhaisin analyysiarvo, joka voidaan havaita yhtäpitävästi (95 %:n osumamäärä tai 5 %:n tyypin II virhe). GIS:n LoD määritettiin pienimpänä

kasvainsisältönä, jolla saavutetaan ≥ 95 %:n GIS-havainto, ja BRCA:n pienten DNA-varianttien ja LR:ien LoD määritettiin varianttialleelien esiintymistiheytenä (VAF). Munasarjasyövän FFPE-DNA-näytteitä käytettiin BRCA:n pienille DNA-varianteille, GIS:lle ja BRCA LR:lle ≥ 3 eksonia. Rintasyövän FFPE-DNA-näytettä käytettiin BRCA LR:lle < 3 eksonia, koska FFPE-munasarjasyöpäkudosta ei ollut saatavilla. Näytteet laimennettiin useille testitasoille, joista kustakin saatiin 12 havaintoa reagenssierää ja varianttia kohden usean käyttäjän toimesta kolmena ei-peräkkäisenä päivänä kahta reagenssierää käyttäen. Kahden reagenssierän suurempi LoD otettiin havaitsemisrajaksi kyseiselle variantille ([Taulukko 52](#)).

Taulukko 52 LoD – BRCA:n pienet DNA-variantit, BRCA LR ja GIS

Varianttityyppi	Varianttiluokka	C95
BRCA:n pienet DNA-variantit	SNV	0,05 VAF
	Insertiot tai deleetiot ≥ 10 bp	0,06 VAF
	Insertiot tai deleetiot < 10 bp	0,07 VAF
	Homopolymeerialueiden variantit ≥ 5 bp	0,07 VAF
BRCA:n suuret uudelleenjärjestymiset (LR)	LR < 3 eksonia	0,61 VAF
	LR ≥ 3 eksonia	0,46 VAF
GIS	GIS	33 %:n kasvainsisältö

Häiritsevät aineet

Mahdollisten endogeenisten ja eksogeenisten aineiden vaikutus TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen suorituskkyyn arvioitiin endogeenisellä aineella (hemoglobiini), joka liitettiin näytteisiin nukleiinihapon eristysprosessin aikana, sekä eksogeenisillä aineilla (etanoli, proteinaasi K, pesupuskuri, parafiini, ksyleeni ja ylimääräiset indeksialukkeet), jotka lisättiin puhdistettuun nukleiinihappoon ennen kirjaston valmistelua. Yksi tai useampi käyttäjä loi näytekirjastoista neljä replikaattia. Kaikkien aineiden osalta BRCA:n pienten DNA-varianttien, BRCA:n LR:ien ja GIS:n analysointiin käytettiin 10:tä munasarjasyövän FFPE-näytettä. Nekroosin vaikutusta arvioitiin niin ikään kolmen eri FFPE-munasarjasyöpänäytteen sarjalla, jossa esiintyi eritasoisia nekroottisia kudoksia (10–20 %). Kullekin nekroosinäytteelle sisällytettiin makrodissektoitu kontrolli, jossa ei ollut nekroosia. Neljää DNA-kirjastojen ja niiden kontrollien replikaattia käsiteltiin yhdessä. Ainekohtaisia näyttereplikaatteja verrattiin kaikkien häiritsevien aineiden osalta vastaaviin kontrollireplikaatteihin. Hemoglobiini (4 mg/ml), etanoli (5 %), proteinaasi K (kaksinkertaisella pitoisuudella edustavaan eristysmenetelmään nähden), pesupuskuri (2,5 %), parafiini (25 % homogenoidusta käytetystä kudoksesta), ksyleeni (0,0001 %) ja indeksialukkeet (30 %:n ylijäämä) eivät häiritse BRCA:n pienten DNA-varianttien, BRCA:n LR:ien ja GIS:n havaitsemista. Minkään testatun häiritsevän aineen esiintyminen ei vaikuttanut BRCA:n pienten DNA-varianttien VAF-tasoihin tai GIS:ään. Nekroottisen kudoksen esiintyminen 20 %:iin asti ei häirinnyt BRCA:n pieniä DNA-variantteja tai GIS:iä. BRCA:n LR:iden nekroosia ei arvioitu, koska BRCA:n LR-variantin sisältävää nekroottista FFPE-munasarjasyöpänäytettä ei ollut saatavilla.

Nukleiinihapon syötteen titrauksen varmistusrajat

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) vaatii vakiomääräisen 40 ng:n DNA-näytesyötteen. Määrityksen suorituskky arvioitiin käyttämällä yhdeksää munasarjan FFPE-kudoksesta eristettyä DNA-näytettä toleranssien määrittämiseksi sellaiselle nukleiinihapposyötteen vaihtelulle, joka voisi johtaa määrityksen epäonnistumiseen tai vaikuttaa kielteisesti sen tuotoksiin. Jokainen FFPE-näyte sisälsi yhden tai useamman BRCA:n pienen DNA-variantin, BRCA LR:n tai GIS:n, ja se testattiin viidellä syötemäärällä (20 ng, 30 ng, 40 ng [nimellinen], 60 ng ja 100 ng) kolminkertaisina rinnakkaisina näytteinä. Tulokset osoittivat, että syötemäärän ero ei vaikuttanut BRCA:n pienen DNA-variantin havaitsemiseen, BRCA LR:n tunnistukseen ja GIS:n tilaan.

Tulokset osoittivat myös, että nukleiinihapposyötöissä, jotka olivat kaksi kertaa nimellisarvon alapuolella, esiintyi enemmän laadunvalvontavikoja, mikä johti varianttintunnistuksessa arvioitujen näytteiden alhaisempaan määrään. 20 ng:n syötemäärällä kirjaston validiteettiaste oli 55,5 % johtuen virheistä eksonikattavuuden prosenttiosuudessa tasolla 50X (PCT_EXON_50X) ja eksonin mediaanikattavuudessa (MEDIAN_EXON_COVERAGE). 20 ng:n syötemäärä ei vaikuttanut BRCA:n pienen DNA-variantin VAF- tai GIS-arvoon.

Ristikontaminaatio

Ristikontaminaatiotutkimuksella arvioitiin, ilmeneekö vääriä positiivisia tuloksia, jotka johtuivat kuoppien välisestä kontaminaatiosta näytekirjaston valmistelun aikana tai peräkkäisten sekvensointiajojen välisestä kontaminaatiosta. Analyysi tehtiin BRCA:n pienille DNA-varianteille, BRCA LR:lle ja GIS:lle. Kirjastot valmisteltiin karakterisoiduista FFPE-munasarjasyöpänäytteistä ruutuasetteluna vaihtoehtoisin näyttein kuoppien välisen kontaminaation arvioimiseksi ja vaihtoehtoisilla indekseillä ajojen välisen kontaminaation arvioimiseksi, kun sekvensointi tehdään peräkkäin samalla NextSeq 550Dx -laite -laitteella. Ristikontaminaatiotutkimus osoitti 0,8 %:n kontaminaatioasteen (2 kontaminaatiotapahtumaa 252:sta), jotka tunnistettiin tutkimalla kussakin näytteessä havaittuja variantteja. Kontaminaatiotapahtumia ei löytynyt, kun vastaanottajakirjastoja analysoitiin BRCA:n pienten DNA-varianttien ja BRCA LR:n varianttintunnistuksen perusteella. Kaksi havaittua kontaminaatiotapahtumaa olivat GIS:n virheellisiä positiivisia tuloksia GIS-vastaanottajanäytteissä, mikä johtui GIS:n sisäisestä vaihtelusta ja siitä, että näiden kahden näytteen GIS oli lähellä päätöksen kynnsarvoa.

Tutkimuksessa osoitettiin, että TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen ristikontaminaation odotetaan olevan vähäistä näytekuoppien ja ajojen välillä. Nämä tulokset yhdessä ohjelmiston kontaminaatiometriikan kanssa vähentävät näytteiden kontaminaatiosta johtuvien väärin varianttitulosten riskiä.

Nukleiinihapon uuttamispakkauksen arviointi

Kolme kaupallisesti saatavilla olevaa DNA:n uuttamispakkausta arvioitiin TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksellä. Kolme pakkausta erosivat toisistaan parafiinin poistoaineen ja nukleiinihapon sitomisvaiheiden osalta ([Taulukko 53](#)). Pakkaus 3 oli ensisijainen uuttamispakkaus, jota käytettiin TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen suorituskyyvyn määrittämisessä.

Viisi munasarjojen FFPE-näytettä altistettiin nukleinihapon eristämiseksi (kolme pakkausta x kaksi käyttäjää x kolme päivää x kaksi replikaattia) DNA:n saamiseksi (yhteensä 36 havaintoa). Kvalitatiivinen analyysi osoitti, että minkään varianttityypin (BRCA:n pienet DNA-variantit, BRCA LR:t, GIS) tunnistuksessa ei ollut havaittavissa eroja, koska kaikkien varianttien havaintojen PPC-arvot olivat > 97 %. Kvantitatiivinen analyysi ei osoittanut pakkausten välillä merkitsevää eroa BRCA:n pienten DNA-varianttien VAF ja GIS osalta.

Taulukko 53 Pakkauksen ominaisuudet

Pakkaus	Sarjan nimi	Parafiinin poistoaine	Nukleinihapon sidonta
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE -kudos	Ksyleeni	Pylväs
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Mineraaliöljy	Magneettihelmet
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Tekijänoikeuksin suojattu parafiininpoistoratkaisu	Pylväs

Reagenssin stabiilius

Reaaliaikainen stabiilius

Reaaliaikainen stabiilius arvioitiin kuudella FFPE-munasarjasyöpäkudoksenäytteellä. Kolme reagenssierää testattiin kuudessa eri aikapisteessä, jotka oli erotettu toisistaan vastaavin aikavälein (3 kuukautta, 6 kuukautta, 9 kuukautta, 13 kuukautta, 19 kuukautta ja 25 kuukautta). Kaksi käyttäjää suoritti kirjaston valmistelutapahtumat kullekin erälle, mukaan lukien kolme replikaattia kustakin näytteestä, eli yhteensä kuusi replikaattia erää kohden. Kohdennettujen BRCA:n pienten DNA-varianttien yhdistelmä-PPC oli 100 %, kohdennettujen BRCA LR:n yhdistelmä-PPC oli ≥ 92 % ja GIS:n yhdistelmä-PPC oli ≥ 83 %. Lisäksi GIS:n tai BRCA:n pienen DNA-variantin VAF:n aikaan liittyviä merkittäviä eroja ei havaittu.

Käytönaikaisen pakkauksen stabiilius

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityspakkauksen käytönaikainen stabiilius arvioitiin vakiokäyttöolosuhteissa käyttöiän aikana useiden pakkausikäytöjen tukemiseksi. Reagenssisarjan pakastetut komponentit altistettiin useille pakastus-/sulatusjaksoille ja jääkaappisäilytysten reagenssien annettiin lämmitä huoneenlämpöön ja testattiin enintään pakkauksen neljän käyttökerran tukemiseksi. Kaikki laadunvalvontakriteerit täyttyivät kaikkien testattujen pakastus- ja sulatusjaksojen ja aikapisteiden osalta. Varianttidentifiointi arvioitiin BRCA:n pienten DNA-varianttien, BRCA:n LR:ien ja GIS:n osalta. Tulokset tukevat enintään neljää pakkauksen pakastus-/sulatusjaksoa. Lisäksi yksi käyttäjä käytti yhtä reagenssisarjaa yhteensä 24 DNA-näytteen valmisteluun osoittaen, että reagenssitilavuus on riittävä 24 DNA- ja 24 HRD-kirjastolle.

Kuljetuksen stabiilius

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityspakkauksen kuljetuksen stabiiliutta arvioitiin yhdeksällä munasarjasyövän FFPE-näytteellä TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -reagenssisarjojen toimivuuden osoittamiseksi simuloituille jakeluolosuhteille altistumisen jälkeen. Kahdeksaa munasarjasyövän FFPE-näytettä käytettiin toimivuuden osoittamiseen, kun reagenssisarja oli altistettu simuloituille kansainvälisille kesän ja talven lämpötilaprofiileille. Toiminnallinen testaus suoritettiin altistumisen jälkeen edellä mainittuja näytteitä käyttämällä, ja se koostui kunkin näytteen 6–12 replikaatista olosuhdetta kohden. Myös sarjojen fyysisiä ominaisuuksia tarkasteltiin, ja niiden havaittiin pysyvän samoina kaikkien testitapausten jakelun jälkeen. Toiminnallisessa testauksessa pääteltiin, että lähetys ei vaikuttanut negatiivisesti BRCA:n pienten DNA-varianttien (PPC $\geq 96\%$), BRCA LR:ien (PPC $\geq 94\%$) tai GIS:n (PPC = 100 %) tunnistukseen kontrolliolosuhteen osalta.

Näytteen stabiilius

Nukleiinihappojen stabiilius

Nukleiinihappojen (DNA) stabiilius ja niihin liittyvä kvantitointi TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen kanssa käyttöä varten arvioitiin käyttämällä munasarjasyövän FFPE-kudosnäytteitä. FFPE-näyteblokit leikattiin leikkeiksi ja DNA eristettiin. Uutettu nukleiinihappo sekoitettiin perusteellisesti, kvantifioitiin, tarkistettiin nukleiinihapon laadun osalta ja jaettiin kahteen sarjaan kertakäyttöisiä putkia, jotka jäädettiin kahden aikapisteen ajaksi: T0 (kontrolli) ja T1 (28 päivän tueksi). Kaikki eristetty DNA säilytettiin $-25 - -15\text{ °C}$:ssa, kunnes se testattiin T0- tai T1-aikapistellä useilla replikaateilla ja usean käyttäjän toimesta. T1:tä verrattiin T0:aan BRCA:n pienten DNA-varianttien, BRCA:n LR:ien ja GIS:n osalta. Tiedot osoittavat, että nukleiinihapot ja niiden kvantitointi TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen kanssa käyttöä varten ovat stabiileja enintään 28 päivän ajan, kun niitä säilytetään suositelluissa lämpötiloissa ($-25 - -15\text{ °C}$).

Kirjaston stabiilius

Kutakin viittä määrityksen turvallista pysähtymispistettä (katso [Taulukko 54](#)) käyttävien kirjastojen stabiiliutta arvioitiin käyttämällä munasarjasyövän FFPE-kudosnäytteitä ja yhtä rintasyövän FFPE-kudosnäytettä. Kontrollikirjastot (T0, ei pysähtymispisteitä) sekvensoitiin välittömästi työnkulun lopuksi. Samojen kirjastojen alikvootteja pidettiin pysähtymispisteissä $-25...-15\text{ °C}$:ssa kohdassa [Taulukko 54](#) ilmoitettuja päiviä vastaavan ajan (T1) verran. T1:tä verrattiin T0:aan BRCA:n pienten DNA-varianttien, BRCA:n LR:ien ja GIS:n osalta. Tiedot osoittavat, että TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksestä luotujen kirjastojen stabiilius vastaa käyttöohjeita.

Taulukko 54 Kirjaston säilytysajat

Kirjaston tyyppi	Levy	Päivien lukumäärä
Fragmentoitu gDNA	LP PCR	≤ 7
Esirikastus	ALS PCR	≤ 30

Kirjaston tyyppi	Levy	Päivien lukumäärä
Jälkirikastus	ELU2 PCR	≤ 7
Jälkirikastuksen PCR	PL PCR	≤ 30
Normalisoitu	NL PCR	≤ 32

Objektilasille preparoidun FFPE-kudoksen stabiilius

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisessä käytettävän, objektilasille preparoidun FFPE-kudoksen stabiiliutta arvioitiin leikkaamalla FFPE-näyteblokit (5 µm:n leikkeet) kymmenestä FFPE-munasarjasyöpäkudoksenäytteestä, jotka oli valmistettu preparaateiksi objektilaseille, minkä jälkeen niitä säilytettiin huoneenlämpötilassa (22 °C) kahta aikapistettä varten: T0 (kontrolli) ja T1 (28 päivän tueksi). Nukleinihappomateriaali kvantifioitiin ja prosessoitiin sitten TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisellä 24 tunnin kuluessa kunkin aikapisteen osalta. Useat käyttäjät testasivat kunakin ajankohtana useita replikaatteja näytettä kohti. T1:tä verrattiin T0:aan BRCA:n pienten DNA-varianttien, BRCA:n LR:ien ja GIS:n osalta. Varianttintunnistukset arvioitiin. Tiedot osoittavat, että objektilasille preparoitu FFPE-kudos, jota käytetään TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisessä, on stabiilia huoneenlämmössä enintään 28 päivän ajan.

Kliinisen HRD-suorituskyvyn vertailututkimus

Jotta TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittäminen voitiin validoida CDx:nä valituille munasarjasyöpäpotilaille LYNPARZA (olaparibi) -hoitoa varten, kliiniseen PAOLA-1-tutkimukseen (NCT02477644) mukaan otettujen potilaiden jäännösnäytteet testattiin kliinisen vertailututkimuksen tueksi.

Tutkimus toteutettiin TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisessä ja PAOLA-1:ssä käytetyn kliinisen tutkimusmäärittämisessä (CTA) välisen HRD-tilan yhdenmukaisuuden arvioimiseksi ja olaparibin kliinisen tehon arvioimiseksi TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisellä tunnistetuilla HRD-positiivisilla potilailla. PAOLA-1 oli vaiheen III satunnaistettu, kaksoissokkoutettu, lumelääkekontrolloitu monikeskustutkimus, jossa tutkittiin olaparibin ja bevasitumabin yhdistelmän kliinistä tehoa ensilinjan ylläpitohoitona edennyttä munasarjasyöpää sairastavilla potilailla. Potilaiden HRD-tila määritettiin satunnaistamisen jälkeen CTA-määrittämisellä ennen ensisijaista analyysiä. Ensisijainen päätetapahtuma oli etenemättömyysaika (PFS), jonka määritelmänä käytettiin aikaa satunnaistamisesta etenemiseen tutkijan suorittaman muokatun RECIST 1.1 -arvioinnin mukaan, tai kuolema. PAOLA-1-tutkimukseen satunnaistetusta 806 potilaasta TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -testaukseen saatiin 399 jäännösnäytettä. Niiden tutkittavien väestötiedot, joilla oli käytettävissä olevia TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -tuloksia, olivat samankaltaisia kuin PAOLA-1-tutkimuksessa. Vastaavasti osallistujien ominaisuudet olivat yleisesti samankaltaisia niiden henkilöiden välillä, joiden HRD-tulos oli positiivinen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittämisessä verrattuna niihin, joiden HRD-tulos oli positiivinen CTA-määrittämisessä.

Yhtäpitävyystulokset

399 näytteestä, jotka olivat saatavilla TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -testausta varten, 382 tuotti arvioitavissa olevan tuloksen. 17 ei-arvioitavissa olevaa näytettä eivät tuottaneet tulosta joko testin laadunvalvonnan (N = 12) tai patologisen arvioinnin (N = 5) epäonnistumisen vuoksi (määritykseen kelpaamaton osuus 3 % [12/394]). Yhteensä 365:lla tutkimukseen kirjatulla potilaalla oli näytteitä, joista saatiin arvioitavissa olevia CTA- ja TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -tuloksia. [Taulukko 55](#) esittää TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -tulosten yhtäpitävyyden CTA-tuloksiin nähden niiden näytteiden osalta, joista saatiin kelpoisia tuloksia.

Taulukko 55 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)- ja CTA-tulosten välinen yhtäpitävyys HRD:n havaitsemisessa

		CTA-tulos		
		HRD-positiivinen	HRD-negatiivinen	Yhteensä
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksen tulos	HRD-positiivinen	204	12	216
	HRD-negatiivinen	5	144	149
	Yhteensä	209	156	365
Yhtäpitävyystilastot	PPA % (n/N; 95 %-n CI*)	97,6 % (204/209; 94,5 %, 99,2 %)		
	NPA % (n/N; 95 %-n CI*)	92,3 % (144/156; 86,9 %, 96,0 %)		
	OPA % (n/N; 95 %-n CI*)	95,3 % (348/365; 92,6 %, 97,3 %)		

* CI perustuen eksaktiin binomiaaliseen menetelmään (Clopper ja Pearson, 1934).

Kliinisen tehokkuuden tulokset

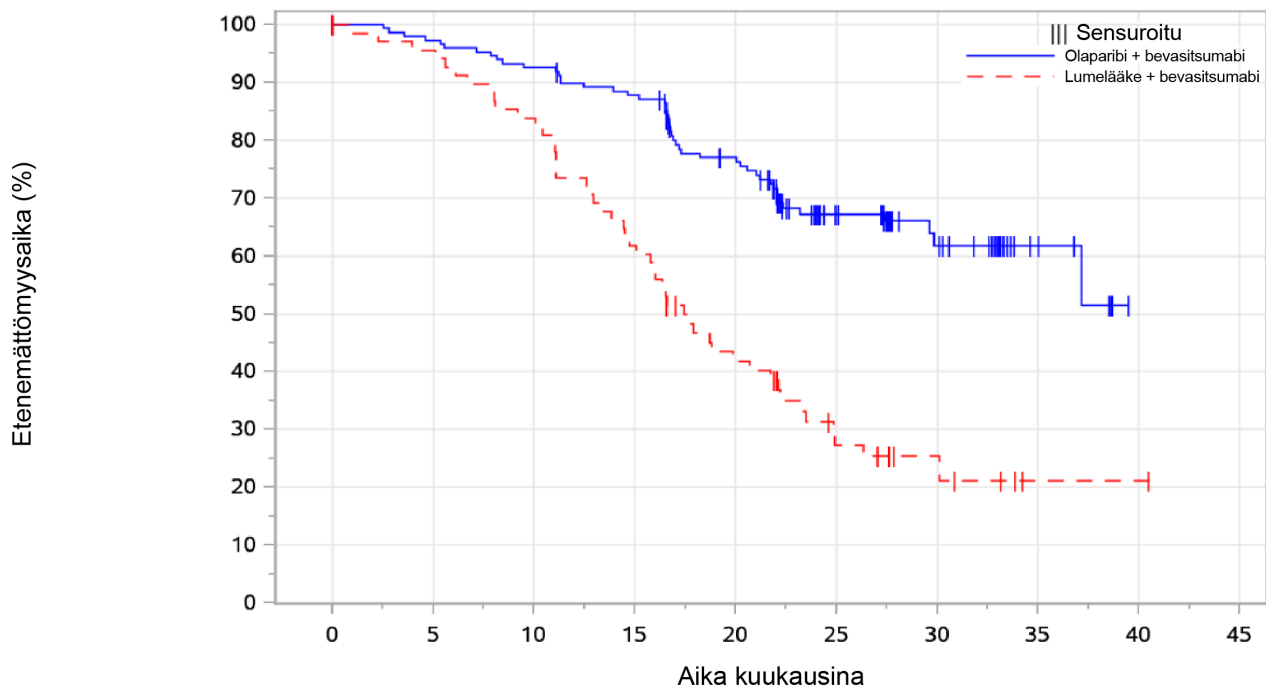
Määrityksen TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kliininen suorituskyky selvitettiin määrittämällä kliininen teho HRD-positiivisessa populaatiossa. Olaparibin ja lumelääkkeen hoitoryhmien etenemättämyysajan (PFS) riskisuhteet (HR) laskettiin käyttämällä korjaamatonta Coxin suhteellisten vaarojen mallia. [Taulukko 56](#) näyttää PFS-riskisuhteet CTA- ja TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksissä HRD-positiivisilla osallistujilla. [Kuva 4](#) näyttää Kaplanin-Meierin käyrät PFS:lle TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-positiivisilla osallistujilla. CTA- ja TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrityksissä HRD-positiivisilla populaatioilla PFS-riskisuhde oli vastaavasti 0,33 (95 %-n CI: 0,25, 0,45) ja 0,32 (95 %-n CI: 0,22, 0,48). Tämä edusti 67 %-n ja 68 %-n vähenemistä etenemis- tai kuolemanriskissä olaparibi- ja bevasitumabiryhmässä verrattuna lumelääkkeen ja bevasitumabin yhdistelmän ryhmään. Imputoitujen puuttuvien CDx-tulosten tehokkuutta koskeva herkkyysanalyysi osoitti, että PFS-riskisuhteet imputoiduissa HRD-positiivisissa populaatioissa olivat yhdenmukaisia ensisijaisten analyysiarvioiden kanssa.

Taulukko 56 Kliininen tehokkuus CTA- ja TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyssä

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

¹ PFS-mediaani kuukausina.² Rajatulomenetelmästä (Kaplan-Meier) sensuroituille tiedoille.³ Perustuu osittamattomaan Coxin regressiomalliin, jossa hoito on kovariaatti.⁴ NR = Ei saavutettu

Kuva 4 Kaplanin-Meierin käyrä – PFS TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) -määrittelyllä tunnistetuilla HRD-positiivisilla osallistujilla

**Riskiryhmään kuuluva**

Olaparibi + bevasitsumabi	149	144	137	129	101	60	29	8	0	0
Lumelääke + bevasitsumabi	71	65	57	42	26	14	6	1	1	0

Lähdeviitteet

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). Julkaistu 2014. Päivitetty lokakuussa 2023. Haettu 7.3.2025.
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

Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirja nro 200080934 v00	Toukokuu 2026	Ensimmäinen versio.

Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illumina-yhtiöltä ennakoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patentti-, tavaramerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä asiakirjassa kuvattuja ohjeita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tässä kuvattujen tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI KAIKKIA TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA NOUDATETA TÄSMÄLLISESTI, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2026 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc. -yhtiön tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot ovat verkkosivustolla www.illumina.com/company/legal.html.

Yhteystiedot



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

CE
2797



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

Tuotteiden merkinnät

Katso kaikkien tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset verkko-osoitteesta support.illumina.com käyttämäsi pakkauksen välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).

Tiivistelmä turvallisuudesta ja suorituskyvystä (SSP, Summary of Safety and Performance) on eurooppalaisen lääkekinnälistien laitteiden tietokannan (Eudamed) käyttöönoton jälkeen osoitteessa

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Se on yhdistetty yksilölliseen laitemallin tunnisteeseen (Basic UDI-DI) (0081627002TSOHRDDGRK).