

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

Notice (EU)

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT. POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Utilisation prévue

Le test HRD TruSight- Oncology Comprehensive (DRAGEN) est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* qui utilise un séquençage ciblé de nouvelle génération pour permettre l'évaluation du déficit de recombinaison homologue (HRD) à l'aide d'ADN extrait d'échantillons de tissu tumoral fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) provenant de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire à l'aide de l'instrument Illumina® NextSeq-550Dx. Le test peut être utilisé pour détecter les variants nucléotidiques uniques, les insertions, les délétions et les grands réarrangements dans les gènes BRCA1 et BRCA2, et signaler un score d'instabilité génomique (SIG).

Le test est destiné à servir de diagnostic compagnon pour identifier les patients atteints d'un cancer qui peuvent bénéficier du traitement par la thérapie ciblée indiquée dans le [Tableau 1](#), conformément à l'étiquetage du produit thérapeutique approuvé.

Tableau 1 Indication de diagnostic compagnon

Type de tumeur	Biomarqueur(s) détecté(s)	Thérapie
Cancer de l'ovaire, y compris cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope et cancer péritonéal primitif	Déficit de recombinaison homologue (HRD) (défini comme des mutations délétères ou délétères suspectées dans les gènes BRCA1 et BRCA2 et/ou un score d'instabilité génomique positif)	LYNPARZA® (olaparib)

Résumé et explication du test

Description clinique

Le cancer de l'ovaire a le taux de mortalité le plus élevé parmi les tumeurs malignes gynécologiques.¹ Le cancer de l'ovaire comprend les cancers épithéliaux de l'ovaire, des trompes de Fallope et du péritoine primitif, qui partagent tous une origine biologique commune et sont considérés ensemble à des fins thérapeutiques.^{2,3} Environ la moitié des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire séreux et endométrioïde de haut grade, qui sont des sous-catégories histologiques applicables à prendre en compte, portent des défauts génomiques dans la voie de réparation de la recombinaison homologue qui entraînent un HRD.⁴ La présence de HRD est associée à une sensibilité à la chimiothérapie à base de platine⁵ et à une réponse clinique aux inhibiteurs de la poly (adénosine diphosphate [ADP]-ribose) polymérase (PARP) (PARPi), une classe de thérapies ciblées pour le cancer de l'ovaire,⁶⁻¹² entraînant une amélioration de la survie sans progression et globale.^{5,13,14} Conformément aux résultats des études cliniques séminales,^{6,7,12,15} l'éligibilité au traitement par PARPi dans le cancer de l'ovaire

peut être basée sur le statut HRD positif.¹⁶ PAOLA-1 était une étude multicentrique de phase III, randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo, évaluant l'efficacité clinique de l'olaparib plus bévacicumab en tant que traitement d'entretien de première intention pour les patients atteints d'un cancer de l'ovaire avancé.¹² Le TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD Le test (DRAGEN) a été validé à l'aide d'échantillons provenant de patients inclus dans l'essai clinique PAOLA-1.

Parmi les divers mécanismes sous-jacents qui altèrent la voie de réparation de la recombinaison homologue, les mieux caractérisés sont les mutations germinales et/ou somatiques de perte de fonction dans les gènes BRCA1 et BRCA2.^{4,13,17} Les tests qui évaluent l'instabilité génomique (p. ex., substitutions, délétions, altérations du nombre de copies et réarrangements structuraux) évaluent la présence d'une cicatrice génomique ou d'une signature mutationnelle indiquant la présence d'un HRD, quelle que soit la cause sous-jacente. Le SIG est une mesure de l'instabilité génomique qui combine des informations sur les transitions d'état à grande échelle (LST), la perte d'hétérozygotie (LOH) et le déséquilibre télomérique-allélique (TAI). Les données d'essais cliniques disponibles étayaient la validité clinique du SIG en tant que biomarqueur qui identifie les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire de type sauvage BRCA qui tirent des bénéfices significatifs du traitement par PARPi.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est un test de diagnostic compagnon (CDx) de séquençage qualitatif de nouvelle génération (NGS) qui rapporte le statut HRD chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire en détectant de petits variants d'ADN et des délétions au niveau de l'exon (appelés grands réarrangements [LR]) dans les gènes BRCA1 et BRCA2, en association avec l'évaluation du SIG par rapport à un seuil de 42.

Pour obtenir une liste des régions des gènes BRCA1 et BRCA2 exclues de la définition des variants, consulter *Liste de blocage TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (document n° 200066147)* disponible sur le site d'assistance Illumina.

Principes de procédures

Le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est un test distribué qui est effectué manuellement en utilisant l'acide nucléique extrait comme matériau d'entrée. L'ADN extrait du tissu FFPE est utilisé pour préparer des bibliothèques, qui sont ensuite enrichies pour les gènes HRD et séquencées sur l'instrument NextSeq 550Dx.

Le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) implique les processus suivants.

- **Préparation et enrichissement de la bibliothèque :** à partir du tissu FFPE, 40 ng d'ADN génomique (ADNg) sont cisaillés en petits fragments. Les adaptateurs universels pour le séquençage sont ligaturés sur les fragments d'ADNg. Les séquences d'adaptateurs P5 et P7 sont incorporées dans chaque bibliothèque pour permettre la capture de fragments de bibliothèque à la surface de la flow cell pendant le séquençage. Les adaptateurs comprennent des séquences d'index i5 et i7 pour identifier chaque échantillon individuel et des molécules individuelles à l'aide d'identifiants moléculaires uniques (UMI). Les bibliothèques sont ensuite enrichies pour les gènes d'intérêt spécifiques à l'aide d'une méthode basée sur la capture. Les séquences de sondes biotinylées qui couvrent les régions génétiques d'intérêt ciblées par le test sont hybridées aux bibliothèques. Les sondes et les bibliothèques ciblées hybrides sont isolées des bibliothèques non ciblées par capture avec des particules magnétiques de streptavidine. Les bibliothèques enrichies ciblées sont

lavées et amplifiées. La quantité de chaque bibliothèque enrichie est ensuite normalisée à l'aide d'une méthode basée sur les billes pour assurer une représentation égale dans les bibliothèques regroupées pour le séquençage.

- **Séquençage et analyse principale** : les bibliothèques normalisées enrichies sont regroupées et agglomérées sur une flow cell, puis séquencées à l'aide d'une chimie de séquençage par synthèse (SBS) sur le NextSeq 550Dx. La chimie SBS utilise une méthode de terminaison réversible pour détecter les bases de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) uniques marquées par fluorescence lorsqu'elles sont incorporées dans les brins d'ADN en croissance. Pendant chaque cycle de séquençage, un seul dNTP est ajouté à la chaîne d'acide nucléique. L'étiquette dNTP sert de terminaison pour la polymérisation. Après chaque incorporation de dNTP, le colorant fluorescent est imagé pour identifier la base, puis clivé pour permettre l'incorporation du nucléotide suivant. Quatre dNTP liées au terminateur réversibles (A, G, T et C) sont présentes sous forme de molécules uniques et distinctes. Par conséquent, la concurrence naturelle minimise les biais d'incorporation. Pendant l'analyse principale, les définitions de base sont effectuées directement à partir des mesures d'intensité du signal pendant chaque cycle de séquençage, ce qui entraîne un séquençage base par base. Un score de qualité est attribué à chaque définition de base.
- **Analyse secondaire** : le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) réside sur le serveur DRAGEN associé à l'instrument NextSeq 550Dx pour faciliter la configuration de l'analyse TSO Comprehensive (UE, DRAGEN) et effectuer l'analyse secondaire des résultats de séquençage. Le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) effectue une analyse qui comprend la validation du traitement de l'analyse et du contrôle qualité, suivie du démultiplexage, de la génération de fichiers FASTQ, de l'alignement et de la définition des variants. Le démultiplexage sépare les données des bibliothèques groupées en fonction des index de séquence uniques qui ont été ajoutés pendant la procédure de préparation de la bibliothèque. Le logiciel génère des fichiers intermédiaires FASTQ qui contiennent les lectures de séquençage et les scores de qualité pour chaque échantillon, à l'exclusion des lectures des clusters qui n'ont pas réussi le filtre. Les lectures de séquençage sont ensuite alignées sur un génome de référence pour identifier une relation entre les séquences et un score est attribué en fonction des régions de similarité. Les lectures alignées sont écrites dans des fichiers au format BAM. Le logiciel de test utilise des algorithmes distincts pour appeler les petits variants d'ADN BRCA1 et BRCA2, les grands réarrangements BRCA1 et BRCA2 et le SIG. Plusieurs sorties sont générées par le module logiciel d'analyse, y compris les métriques de séquençage et les fichiers de format de définition de variant (VCF). Les fichiers VCF contiennent des renseignements sur les variants que l'on trouve à des positions spécifiques dans un génome de référence. Des métriques de séquençage et des fichiers de sortie individuels sont générés pour chaque échantillon.
- **Analyse tertiaire** : l'analyse tertiaire, effectuée par le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN), consiste en la définition de CDx et la génération de rapports de résultats. Les résultats des variants interprétés sont résumés dans le rapport des résultats TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Consulter le *Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (document n° 200080937)* pour plus de détails sur l'analyse secondaire et tertiaire.

Limites de la procédure

Destiné au diagnostic *in vitro* uniquement.

- À utiliser uniquement sur ordonnance. Le test doit être commandé par un professionnel de santé qualifié conformément aux réglementations du laboratoire clinique.
- Les décisions relatives aux soins et au traitement des patients doivent être fondées sur le jugement médical indépendant du médecin traitant, en tenant compte de toutes les informations applicables concernant l'état du patient, telles que les antécédents du patient et de sa famille, les examens physiques, les informations provenant d'autres tests diagnostiques et les préférences du patient, conformément au traitement recommandé dans une communauté donnée.
- La qualité de l'échantillon FFPE est très variable. La qualité peut être affectée comme suit.
 - Les échantillons qui n'ont pas subi de procédures de fixation standard peuvent ne pas générer d'acides nucléiques extraits qui répondent aux exigences de contrôle qualité du test ([Contrôle qualité à la page 71](#)).
 - Les mutations du facteur somatique peuvent ne pas être détectées de manière fiable si le contenu tumoral (par zone) est inférieur à 20 %.
 - Le SIG peut ne pas être fiable si le contenu tumoral (par zone) est inférieur à 33 %.
- La performance de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) dans les échantillons obtenus auprès de patients ayant subi une greffe d'organe ou de tissu n'a pas été évaluée.
- La détection de contamination peut être affectée comme suit.
 - Dans les génomes fortement réorganisés avec délétions et perte d'hétérozygotie, le logiciel TSO Comprehensive (UE, DRAGEN) peut classer par erreur un échantillon d'ADN comme contaminé (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - La contamination pendant la procédure peut résulter de l'acide nucléique des étapes précédentes du traitement de l'échantillon. Les bonnes pratiques de laboratoire et le respect de toutes les précautions et directives de cette notice aident à éviter la contamination croisée entre les échantillons.
- Un résultat négatif n'exclut pas la présence d'une mutation inférieure aux limites de détection (LoD) du test. Les altérations aux fréquences alléliques inférieures à la LDD établie peuvent ne pas être détectées de manière cohérente.
- La sensibilité pour la détection de petits variants d'ADN peut être affectée par :
 - Contexte génomique de faible complexité.
 - Augmentation de la longueur des variants.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été validé pour détecter les insertions et délétions BRCA jusqu'à 19 pb de longueur et les grands réarrangements BRCA au niveau de l'exon ou plus. Les variants de plus de 19 pb de longueur et les altérations et événements sub-exoniques peuvent ne pas être détectés par le test, mais peuvent avoir un impact sur le statut HRD. Des corrélations clinicopathologiques et biologiques appropriées sont recommandées.
- Les délétions au niveau des exons sont les seuls grands réarrangements signalés par TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Les insertions au niveau des exons ne sont pas rapportées par le test.

Composants du produit

Le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) se compose des composants suivants :

- Kit TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (Illumina réf. catalogue 20140799) : le kit comprend des réactifs avec un volume suffisant pour générer 24 bibliothèques d'ADN. Ce volume inclut des échantillons et des contrôles du patient. Le kit contient l'ensemble de sondes utilisé pour détecter les mutations BRCA. Commandes vendues séparément (voir [Réactifs requis, non fournis à la page 15](#)).



ATTENTION

Les réactifs de préparation de la bibliothèque d'ARN sont fournis avec le kit TSO Comprehensive (DRAGEN), mais ne sont pas nécessaires pour le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

- Kit TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) (Illumina réf. catalogue 20134650) : le kit comprend des réactifs avec un volume suffisant pour générer 24 bibliothèques d'enrichissement d'ADN. Ce volume inclut des échantillons et des contrôles du patient. Le kit contient l'ensemble de sondes utilisé pour la détermination SIG.
- Module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (Illumina réf. catalogue 20132935), qui comprend les composants suivants :
 - Forfaits de réclamations TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)
 - Suite logicielle TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)
 - Kit USB TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

Un technicien de maintenance Illumina installe la version appropriée du Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) et le dossier de réclamations sur le serveur DRAGEN pour l'instrument NextSeq 550Dx. Pour des informations sur le module d'analyse, consulter le *Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (document n° 200080937).

Réactifs

Réactifs fournis

Illumina fournit les réactifs suivants.

Kit TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) (Illumina réf. catalogue 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), réf. 20031118

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	solution aqueuse tamponnée contenant du DNA polymérase T4 et du polynucléotide kinase	-25 °C à -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de la ligase	-25 °C à -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides de séquençage universel	-25 °C à -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides de séquençage universel	-25 °C à -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN polymérase et des nucléotides	-25 °C à -15 °C

* Réactif fourni mais non requis pour TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), réf. 20031119

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solution aqueuse contenant des billes magnétiques	2 °C à 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Solution Tris EDTA	2 °C à 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, réf. 20031120

Ingrédients actifs : solution aqueuse tamponnée contenant des primers oligonucléotidiques à code-barres individuel.



ATTENTION

Ne pas combiner les primers d'indexation CPxx et UPxx dans la même bibliothèque.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, réf. 20031126

Ingrédients actifs : solution aqueuse tamponnée contenant des primers oligonucléotidiques à code-barres individuel.



ATTENTION

Ne pas combiner les primers d'indexation CPxx et UPxx dans la même bibliothèque.

Primer d'indexation	Référence	Quantité	Volume	Index i7	Séquence	Index i5	Séquence	Température de stockage
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCTCTG	-25 °C à -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C

Primer d'indexation	Référence	Quantité	Volume	Index i7	Séquence	Index i5	Séquence	Température de stockage
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), réf. 20031123

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du formamide et des sels	2 °C à 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des billes paramagnétiques en phase solide enrobées de streptavidine de manière covalente	2 °C à 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Solution d'hydroxyde de sodium	2 °C à 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	2 °C à 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, 2-Mercaptoéthanol et formamide	2 °C à 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solution aqueuse contenant des billes magnétiques	2 °C à 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), réf. 20031121

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides	-25 °C à -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un détergent	-25 °C à -15 °C

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN polymérase et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant les primers P5 et P7	-25 °C à -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, 2-Mercaptoéthanol et formamide	-25 °C à -15 °C
PhiX (PX3 ou PhiX)	20031492	1	10 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN génomique PhiX	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, réf. 20031122

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Groupe de sondes oligonucléotidiques	-25 °C à -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Groupe de sondes oligonucléotidiques	-25 °C à -15 °C

* Réactif fourni mais non requis pour TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, réf. 20031127

Les réactifs suivants sont fournis, mais ne sont pas requis pour TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, de l'ADN polymérase, de la RNase H et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des hexamères aléatoires	-25 °C à -15 °C
Reverse transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de la reverse transcriptase	-25 °C à -15 °C

Kit TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) (Illumina réf. catalogue 20134650)

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate), réf. 20140116

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du formamide et des sels	2 °C à 8 °C

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des billes paramagnétiques en phase solide enrobées de streptavidine de manière covalente	2 °C à 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Solution d'hydroxyde de sodium	2 °C à 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	2 °C à 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	1	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, 2-Mercaptoéthanol et formamide	2 °C à 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Solution aqueuse contenant des billes magnétiques	2 °C à 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze), réf. 20140115

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides	-25 °C à -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un détergent	-25 °C à -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	1	550 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN polymérase et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant les primers P5 et P7	-25 °C à -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, 2-Mercaptoéthanol et formamide	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, réf. 20140117

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Groupe de sondes oligonucléotidiques	-25 °C à -15 °C

Réactifs requis, non fournis

Réactifs pré-amplification

- Réactifs d'extraction et de purification d'ADN : consulter la section [Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques à la page 23](#) pour connaître les exigences en matière de réactifs.
- Réactifs de quantification de l'ADN : consulter la section [Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques à la page 23](#) pour connaître les exigences en matière de réactifs.
- TruSight Oncology Controls :
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina réf. catalogue 20090155)
- Éthanol (EtOH) 100 % (200 degrés), qualité biologie moléculaire
- Eau exempte de RNase/DNase

Réactifs post-amplification

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina réf. catalogue 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- EtOH 100 % (200 degrés), qualité biologie moléculaire
- Eau exempte de RNase/DNase

Stockage et manipulation des réactifs

Les boîtes de réactifs suivantes sont expédiées congelées. À conserver entre -25 °C et -15 °C.

Boîte	Référence	Zone du laboratoire
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post-amplification
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplification
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze)	20140115	Post-amplification
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Post-amplification

Les boîtes de réactifs suivantes sont expédiées sur des blocs de gel pour maintenir une température comprise entre 0 °C et 10 °C. À conserver entre 2 °C et 8 °C.

Boîte	Référence	Zone du laboratoire
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post-amplification
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate)	20140116	Post-amplification

 **ATTENTION**

Ne pas stocker les réactifs dans une unité de stockage hors gel ou dans les compartiments de la porte du réfrigérateur.

 **ATTENTION**

Ne pas congeler les réactifs contenant des billes (LNB1, SPB et SMB).

- Des changements dans l'apparence physique des réactifs peuvent indiquer une détérioration des matériaux. En cas de changements dans l'apparence physique (par exemple, une modification de la couleur du réactif ou un trouble), n'utilisez pas les réactifs.
- ERA1-B et TCB1 peuvent contenir des particules liées au produit. Suivre les directives de manipulation pour chaque réactif.
- La stabilité du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été évaluée et les performances démontrées pour un maximum de quatre utilisations du kit. Les réactifs sont stables lorsqu'ils sont conservés aux températures indiquées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte.

Équipements et matériaux

Équipement et matériaux nécessaires, non fournis

Équipement et matériaux pré-amplification

Équipement	Fournisseur
Appareil à ultrason avec accessoires associés Consulter la section Paramètres de configuration de l'appareil à ultrasons pour la fragmentation de l'ADN à la page 20.	Fournisseur de laboratoire général
Vortex	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Incubateurs pour micro-échantillons (2) avec inserts pour plaques MIDI 96 puits (2)	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Centrifugeuse de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Compatible avec les microplaques 96 puits • Capacité de 280 × g (+/- 10 %)	Fournisseur de laboratoire général
Agitateur de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Orbite 2 mm • Peut agiter à 1 200 tr/min et 1 800 tr/min	Fournisseur de laboratoire général
Coin ou rouleau d'étanchéité	Fournisseur de laboratoire général
Support magnétique présentant les caractéristiques suivantes : • Conçu pour la précipitation/séparation des billes paramagnétiques • Aimants sur le côté du support (pas sur le bas) • Compatible avec les plaques MIDI 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes de précision capables de délivrer avec précision des volumes compris entre 2 µl et 1 000 µl avec les caractéristiques suivantes : • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,02 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,1 µl, 0,2 µl, ou 0,5 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 1 µl ou 2 µl Les pipettes doivent être étalonnées régulièrement et leur précision doit être de l'ordre de 5 % du volume indiqué.	Fournisseur de laboratoire général
Pipette-aide	Fournisseur de laboratoire général
Bloc de glace ou bloc réfrigérant	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes sérologiques de 10 ml	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Jointes adhésives pour plaques 96 puits présentant les caractéristiques suivantes : • Pelable • Convient pour les plaques PCR à jupe complète ou partielle • Adhésif résistant à de multiples changements de température de -20 °C à 100 °C • Exempt de DNase/RNase	Fournisseur de laboratoire général
Tubes de microcentrifugation de 1,7 ml de capacité, sans nucléase	Fournisseur de laboratoire général
Réservoirs à réactifs sans nucléase (compartiment jetable, 50 ml) (ou équivalent)	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 15 ml	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 50 ml	Fournisseur de laboratoire général
Embouts de pipette compatibles résistants aux aérosols	Fournisseur de laboratoire général
Plaques de stockage 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)	Fisher Scientific, référence AB-0859 ou équivalent
Plaques PCR 96 puits compatibles avec thermocycleur, 0,2 ml (puits en polypropylène)	Fournisseur de laboratoire général

Équipement et matériaux post-amplification

Équipement	Fournisseur
Instrument NextSeq 550Dx	Illumina, réf. catalogue 20005715
Centrifugeuse de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Compatible avec les microplaques 96 puits • Capacité de 280 × g (+/- 10 %)	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Thermocycleur présentant les caractéristiques suivantes : • Couvercle chauffant (100 °C) • Comprend une plage de température allant de 4 °C à 99 °C • Précision de la température de $\pm 0,25$ °C • Compatible avec les plaques PCR 96 puits, 0,2 ml • Consulter la section Fréquence de rampe du thermocycleur à la page 22	Fournisseur de laboratoire général
Vortex	Fournisseur de laboratoire général
Incubateur à micro-échantillons avec insert pour plaques MIDI 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Bloc de chaleur sèche avec les spécifications suivantes : • Plage de température de 25 °C à 99 °C • Précision de la température ± 5 °C • S'assurer que les tubes de microcentrifugeuse sont compatibles avec le bloc thermique	Fournisseur de laboratoire général
Agitateur de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Orbite 2 mm • Peut agiter à 1 200 tr/min et 1 800 tr/min	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Coin ou rouleau d'étanchéité	Fournisseur de laboratoire général
Support magnétique présentant les caractéristiques suivantes : • Conçu pour la précipitation/séparation des billes paramagnétiques • Aimants sur le côté du support (pas sur le bas) • Compatible avec les plaques MIDI 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes de précision capables de délivrer avec précision des volumes compris entre 2 µl et 1 000 µl avec les caractéristiques suivantes : • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,02 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,1 µl, 0,2 µl, ou 0,5 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 1 µl ou 2 µl Les pipettes doivent être étalonnées régulièrement et leur précision doit être de l'ordre de 5 % du volume indiqué.	Fournisseur de laboratoire général
Pipette-aide	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Pipettes sérologiques de 10 ml	Fournisseur de laboratoire général
Joints adhésifs pour plaques 96 puits présentant les caractéristiques suivantes : • Pelable • Convient pour les plaques PCR à jupe complète ou partielle • Adhésif résistant à de multiples changements de température de -20 °C à 100 °C • Exempt de DNase/RNase	Fournisseur de laboratoire général
Tubes de microcentrifugation de 2 ml de capacité, sans nucléase	Fournisseur de laboratoire général
Tubes de microcentrifugation de 1,7 ml de capacité, sans nucléase	Fournisseur de laboratoire général
Réservoirs à réactifs sans nucléase (compartiment jetable, 50 ml) (ou équivalent)	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 15 ml	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 50 ml	Fournisseur de laboratoire général
Embouts de pipette compatibles résistants aux aérosols	Fournisseur de laboratoire général
Plaques de stockage 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)	Fisher Scientific, référence AB-0859 ou équivalent
Plaques PCR 96 puits compatibles avec thermocycleur, 0,2 ml (puits en polypropylène)	Fournisseur de laboratoire général
Bloc de glace ou bloc réfrigérant	Fournisseur de laboratoire général

Paramètres de configuration de l'appareil à ultrasons pour la fragmentation de l'ADN

La fragmentation ou le cisaillement de l'ADN influence les performances du test en déterminant la distribution de la taille du fragment, ce qui affecte à son tour la couverture du séquençage. Plusieurs configurations d'ultrasons ciblés ont été évaluées et optimisées pour le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ([Tableau 2](#)).

- Le temps de cisaillement a été ajusté pour maximiser la mesure MEDIAN_EXON_COVERAGE décrite dans la section [Contrôle qualité à la page 71](#). Les temps de cisaillement (consulter le [Tableau 2](#)) et les résultats MEDIAN_INSERT_SIZE différaient selon les configurations.
- Les configurations 1 à 4 et 6 ont été testées avec des tubes en verre à 8 bandes. La configuration 5 utilisait un seul tube en verre. Les capacités volumiques des tubes sont indiquées dans le [Tableau 2](#).
- L'optimisation des configurations 3 à 6 (volumes de bain-marie plus faibles) a utilisé des pulsations.
- Les configurations 3 à 5 ont été cisillées dans des tubes de plus petit volume. Les capacités volumiques des tubes affectent les paramètres de cisaillement.
- La configuration 4 (transducteur en ligne, volume du bain-marie de taille moyenne, eau dégazée) a nécessité un long délai de pulsation (40 secondes) pour obtenir un MEDIAN_EXON_COVERAGE similaire à celui des configurations 1 et 2 à une entrée nominale de 40 ng.
- Les paramètres optimaux pour la configuration 3 ont entraîné une distribution légèrement plus importante de la taille du fragment par rapport aux autres configurations (MEDIAN_INSERT_SIZE était d'environ 5 à 10 paires de base plus grandes).
- Les configurations 3 et 5 utilisaient de l'eau non dégazée et le plus petit volume de bain-marie.
- Les configurations 3 et 5 ont nécessité une entrée d'ADN plus importante (50 ng pour la configuration 3, 60 ng pour la configuration 5) pour obtenir un MEDIAN_EXON_COVERAGE similaire aux 4 autres configurations, qui ont utilisé l'entrée nominale de 40 ng.
- Les configurations 3 et 5 présentent plus de dommages et/ou de dénaturation et donc une masse efficace réduite de molécules d'ADNdb utilisables pour la préparation de la bibliothèque.

Centrifuger les tubes de cisaillement pendant le processus de récupération pour s'assurer que le volume spécifié est récupéré, car toute perte de matériau peut nuire aux performances.

Tableau 2 Configurations de l'ultrasonoriseur focalisé évaluées

Paramètre	Configuration					
	1	2	3	4	5	6
Transducteur	Ligne	Point	Point	Ligne	Point	Ligne
Volume du bain-marie	5 L	5 L	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Eau dégazée	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui
Refroidisseur d'eau	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Température du bain-marie	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Puissance incidente de crête (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% facteur de charge	30	10	30	25	20	25
Cycles par salves	200	200	1000	1000	1000	600 ⁵
Pulsations (salves de 10 secondes)	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Délai entre les pulsations	S.O.	S.O.	10 s	40 s	10 s	10 s
Temps de cisaillement	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Traitement des échantillons	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Taille du lot	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Taille d'échantillon du tube en verre 8-Strip	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Tube unique (50 µl)	130 µl (ou plaque de 96 microTUBE)
Dithering	S.O.	S.O.	S.O.	3 mm Y @ 20 mm/s	S.O.	1,5 mm Y @ 10 mm/s
Équivalent d'entrée d'ADN (pour couverture médiane des exons)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Le temps de cisaillement de 200 secondes se compose de salves de 10 secondes avec 20 répétitions.

² Le temps de cisaillement de 320 secondes se compose de salves de 10 secondes avec 32 répétitions.

Fréquence de rampe du thermocycleur

Il est recommandé d'optimiser la fréquence de rampe du thermocycleur. Par exemple, un modèle testé a été ajusté à partir d'une vitesse de rampe par défaut (et maximale) de 5 °C/s à 3 °C/s pour obtenir des résultats comparables à ceux d'autres modèles avec des vitesses de rampe par défaut plus faibles.

Prélèvement, transport et stockage des échantillons

Suivre les procédures standard lors du prélèvement, du transport, du stockage et du traitement des échantillons.

Exigences relatives aux échantillons

Tissu FFPE

Le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) nécessite 40 ng d'ADN extrait de tissu FFPE péritonéal primaire, de trompe de Fallope ou d'ovaire. Le tissu doit être fixé à l'aide d'un fixateur de formol adapté aux analyses moléculaires (par exemple, formol tamponné neutre à 10 %). Le tissu ne doit pas être décalcifié. Avant d'effectuer le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), l'échantillon de tissu doit être examiné par un pathologiste pour s'assurer qu'il est approprié pour ce test. Un minimum de 20 % de contenu tumoral (par zone) est nécessaire pour détecter les mutations du facteur somatique. Un minimum de 33 % de contenu tumoral (par zone) est nécessaire pour détecter un SIG élevée.

Pour une probabilité élevée d'extraction de 40 ng d'ARN, le volume de tissu recommandé est $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Ce volume équivaut à une surface tissulaire viable cumulée de $\geq 200 \text{ mm}^2$ en utilisant des coupes de $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur, ou $\geq 100 \text{ mm}^2$ en utilisant des coupes de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur. La surface tissulaire cumulée est la somme de la surface tissulaire viable dans toutes les coupes soumises pour extraction. Par exemple, une surface tissulaire cumulée de 200 mm^2 peut être obtenue en extrayant quatre coupes de $5 \mu\text{m}$ avec une surface tissulaire de 50 mm^2 chacune ou cinq coupes de $10 \mu\text{m}$ avec une surface tissulaire de 20 mm^2 chacune. La nécrose tissulaire peut diminuer le rendement en acide nucléique. Pour minimiser la possibilité de résultats faussement négatifs, le tissu peut être macrodisséqué pour éliminer le tissu nécrotique et obtenir un contenu tumoral viable souhaitable.

Le tissu FFPE monté sur lame peut être conservé jusqu'à 28 jours à température ambiante.

Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques

- Extraire l'ADN des échantillons de tissu FFPE à l'aide de kits d'extraction disponibles dans le commerce. Les différences entre les kits d'extraction peuvent avoir un impact sur les performances. Consulter la section [Évaluation du kit d'extraction d'acide nucléique à la page 96](#).
- Conserver l'acide nucléique de stock extrait en suivant les instructions du fabricant du kit d'extraction.
- Conserver l'ADN extrait jusqu'à 28 jours entre -25°C et -15°C .

- Pour éviter les changements de concentration au fil du temps, mesurer l'ADN dans les 28 jours précédant le début de la préparation de la bibliothèque. Quantifier l'ADN à l'aide d'une méthode de quantification fluorométrique qui utilise des colorants de liaison à l'acide nucléique. La concentration en acide nucléique doit être la moyenne d'au moins trois mesures.
- Le test nécessite 40 ng de chaque échantillon d'ADNg avec une concentration d'extraction minimale de 3,33 ng/μl. Le cisaillement nécessite un volume final de 52 μl (0,77 ng/μl) avec un minimum de 40 μl de TEB (fourni) utilisé comme diluant.

Stockage de bibliothèque

Stocker les bibliothèques dans des plaques PCR à faible liaison pendant 7 à 32 jours, selon le type de bibliothèque (consulter le [Tableau 3](#)).

Tableau 3 Temps de stockage de la bibliothèque

Type de bibliothèque	Plaque	Nombre de jours	Température de stockage
ADNg fragmenté	LP PCR	≤ 7	-25 °C à -15 °C
Pré-enrichissement	ALS PCR	≤ 30	-25 °C à -15 °C
Post-enrichissement	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C à -15 °C
PCR post-enrichissement	PL PCR	≤ 30	-25 °C à -15 °C
Normalisé	NL PCR	≤ 32	-25 °C à -15 °C

Avertissements et Précautions

Sécurité



AVERTISSEMENT

Cet ensemble de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. La ventilation doit être appropriée pour la manipulation de matières dangereuses dans les réactifs. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire adaptés au risque d'exposition. Manipuler les réactifs usagés comme des déchets chimiques et les mettre au rebut conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, consulter la FDS à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

- Certains composants de ce test contiennent du formamide, un amide aliphatique qui est une toxine cancérigène probable pour la reproduction. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire. Manipuler les réactifs utilisés comme déchets chimiques et les jeter conformément aux normes de sécurité gouvernementales de votre région. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, consulter la FDS en recherchant le code du produit à l'adresse support.illumina.com/sds.html. (Consulter la section [Réactifs fournis à la page 5](#), pour plus d'informations).
- Certains composants de ce dosage contiennent du 2-mercaptoethanol, un agent réducteur. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. L'utiliser dans un endroit bien aéré et jeter tous les récipients et leurs contenus inutilisés conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales en vigueur. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, consulter la FDS en recherchant le code du produit à l'adresse support.illumina.com/sds.html. (Consulter la section [Réactifs fournis à la page 5](#), pour plus d'informations).
- Certains composants de ce test contiennent de l'hydroxyde de sodium, une base hautement corrosive. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire. Manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et éliminer conformément aux lois et réglementations régionales, nationales et locales applicables. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, consulter la FDS en recherchant le code du produit à l'adresse support.illumina.com/sds.html. (Consulter la section [Réactifs fournis à la page 5](#), pour plus d'informations).
- Certains composants de ce test (EPM) contiennent du chlorure de tétraméthylammonium, un toxique aigu, un irritant cutané et un polluant marin. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire. Manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et éliminer conformément aux lois et réglementations régionales, nationales et locales applicables. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, consulter la FDS en recherchant le code du produit à l'adresse support.illumina.com/sds.html. (Consulter la section [Réactifs fournis à la page 5](#), pour plus d'informations).
- Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient connus pour être infectieux.
- Prendre les précautions de routine en laboratoire. Ne pas injecter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées. Porter des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de test. Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé des échantillons et des réactifs de test.
- Signaler immédiatement tout incident grave relatif à ce produit à Illumina et aux Autorités compétentes des États membres dans lequel l'utilisateur et le patient sont établis.

Laboratoire

- Pour éviter la contamination, organiser le laboratoire avec un flux de travail unidirectionnel. Les zones de pré-amplification et de post-amplification doivent disposer d'un équipement dédié (par exemple, pipettes, embouts de pipette, vortex et centrifugeuse). Pour éviter le transfert du produit d'amplification ou de la sonde, éviter de retourner dans la zone de pré-amplification après avoir pénétré dans la zone de post-amplification.
- Effectuer les étapes de l'Indexation PCR et d'enrichissement dans une zone post-amplification pour éviter le transfert du produit d'amplification.
- Les procédures de préparation de la bibliothèque nécessitent un environnement exempt de RNase/DNase. Décontaminer soigneusement les zones de travail avec un nettoyant inhibant la RNase/DNase. Utiliser des plastiques certifiés exempts de DNase, RNase et ADN génomique humain.
- Pour les procédures post-amplification, nettoyer soigneusement les surfaces de travail et l'équipement avant et après chaque procédure avec une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,5 % fraîchement préparée. Laisser la solution entrer en contact avec les surfaces pendant 10 minutes, puis essuyer soigneusement avec de l'alcool éthylique ou isopropylique à 70 %.
- Utiliser des tubes de microcentrifugation, des plaques, des embouts de pipette et des réservoirs sans nucléase.
- Utiliser un équipement étalonné tout au long du test. S'assurer d'étalonner l'équipement aux vitesses, températures et volumes spécifiés dans ce protocole.
- Utiliser des pipettes de précision pour assurer une distribution précise des réactifs et des échantillons. Étalonner régulièrement conformément aux spécifications du fabricant.
- Utiliser les directives suivantes lorsque vous utilisez des pipettes multicanaux :
 - Pipeter un minimum de $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - S'assurer que les embouts barrière sont bien ajustés et adaptés à la marque et au modèle de pipettes multicanaux.
 - Fixer les embouts avec un mouvement de roulement pour vous assurer que tous les embouts sont bien fixés.
 - Aspirer à un angle de 90°, avec des niveaux de volume de liquide équivalents sur tous les embouts.
 - Mélanger tous les composants après l'administration en pipetant le mélange maître de haut en bas.
 - Après la distribution, s'assurer que le liquide est entièrement distribué à partir de chaque buse.
- S'assurer d'utiliser l'équipement spécifié pour le test et de définir les programmes comme indiqué.
- Les températures indiquées pour le thermocycleur et l'incubateur de micro-échantillons indiquent la température de réaction, pas nécessairement la température définie de l'équipement.

Test

- Éviter la contamination croisée.
 - Suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs.
 - Utiliser du matériel de laboratoire consommable frais et des embouts de pipette frais entre les échantillons et entre les réactifs de distribution.
 - Utiliser des embouts résistants aux aérosols pour réduire le risque de contamination croisée.
 - Utiliser un flux de travail unidirectionnel pour passer des zones de pré-amplification aux zones de post-amplification.
 - Manipuler et ouvrir un seul primer d'indexation à la fois. Reboucher chaque tube index immédiatement après utilisation. Des bouchons supplémentaires sont fournis dans le kit.
 - Changer souvent de gants et s'ils entrent en contact avec des primers d'indexation ou des échantillons.
 - Retirer les tubes de primer d'indexation inutilisés de la zone de travail.
 - Ne pas remettre les réactifs dans les tubes de stockage après utilisation avec une bande de tube, un compartiment ou un réservoir.
 - Mélanger les échantillons avec une pipette et centrifuger la plaque si indiqué.
 - Utiliser un agitateur de microplaques. Ne pas mélanger les plaques à l'aide d'un vortex.
- Ne pas échanger les composants du test de différents lots de kits de réactifs. Les lots de kits de réactifs sont identifiés sur l'étiquette de la boîte de kits de réactifs et sur la fiche de lot de référence.
- Des pratiques de laboratoire adéquates sont nécessaires pour empêcher les nucléases et les produits PCR de contaminer les réactifs, l'instrument, les échantillons et les bibliothèques. La contamination par nucléase et produit PCR peut causer des résultats inexacts et peu fiables.
- Un type de plaque approprié est nécessaire pour une performance et un stockage optimaux du test. S'assurer de suivre les instructions de transfert de plaque dans le [Mode d'emploi à la page 36](#).
- Le défaut de suivre les procédures, telles que spécifiées, peut causer des résultats erronés ou une diminution significative de la qualité de la bibliothèque.
- À moins qu'un point d'arrêt sécurisé ne soit spécifié dans le [Mode d'emploi à la page 36](#), passer immédiatement à l'étape suivante.
- Stocker les réactifs et composants du test à la température spécifiée dans des zones de pré-amplification et de post-amplification désignées.
- Ne pas stocker les réactifs dans une unité de stockage hors gel ou dans les compartiments de la porte du réfrigérateur.
- Ne pas congeler les réactifs contenant des billes (LNB1, SPB et SMB).
- Ne pas utiliser de réactifs qui ont été conservés de manière incorrecte.

- Ne pas s'écarter des procédures de mélange et de manipulation spécifiées pour chaque réactif. Un mélange inadéquat ou un mélange excessif des réactifs à l'aide d'un vortex peut entraîner l'échec des résultats de l'échantillon.
- ERA1-B et TCB1 peuvent contenir des particules liées au produit. Suivre les directives de manipulation pour chaque réactif.
- Préparer les mélanges réactionnels frais et jeter le volume restant après utilisation.
- Préparer toujours de l'éthanol frais à 80 % avec de l'eau exempte de RNase/DNase pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau de l'air, ce qui peut avoir une incidence sur les résultats. Éliminer l'éthanol à 80 % après utilisation conformément aux réglementations locales, nationales et/ou fédérales.
- Transférer le volume d'éluat spécifié. Le transfert d'un volume d'éluat inférieur au volume spécifié pendant les étapes d'éluat peut avoir un impact sur les résultats.
- Suivre les directives suivantes pour les ultrasons. S'assurer de suivre les instructions du fabricant.
 - Charger lentement l'ADNg dans le tube à ultrasons pour éviter de créer des bulles. Des bulles excessives ou un espace d'air dans le tube de cisaillement peuvent entraîner une fragmentation incomplète.
 - Distribuer lentement dans les tubes à ultrasons et éviter les éclaboussures.
 - Pour éviter le déplacement du liquide et la perte d'échantillon, ne pas insérer l'embout de la pipette au fond du tube à ultrasons lors du retrait de l'ADN fragmenté.
- Ne pas pipeter moins de 2 µl d'échantillon.
- Ne pas utiliser de bac pour distribuer les réactifs pour les étapes nécessitant l'ajout de moins de 10 µl de matériau dans chaque puits d'échantillon.
- Utiliser une pipette à embouts fins pour transférer les échantillons d'ADNg fragmenté des tubes de l'appareil à ultrasons vers la plaque de préparation de la bibliothèque (LP).
- Utiliser uniquement des adaptateurs UMI.
- Ne pas utiliser d'adaptateurs SUA1.
- Attribuer différents primers d'indexation à chaque échantillon de bibliothèque pour identifier chaque bibliothèque lorsqu'elle est regroupée pour le séquençage sur une seule flow cell.
- Les index UPxx ou CPxx peuvent être utilisés.
- Ne pas combiner les primers d'indexation CPxx et UPxx dans la même bibliothèque.
- Les mauvaises correspondances entre les échantillons et les primers d'indexation entraînent des résultats erronés en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon. Saisir les ID d'échantillon et attribuer des index dans le module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) avant de commencer la préparation de la bibliothèque. Enregistrer les ID d'échantillon, l'indexation et l'orientation du puits de la plaque pour référence pendant la préparation de la bibliothèque.
- Séquencer un maximum de 16 bibliothèques d'ADN par flow cell. Séquencer au moins six bibliothèques. Suivre les directives dans la section [Nombre de bibliothèques et sélection des index à la page 33](#).

- Après l'étape de liaison dans les sections [Capture des cibles un à la page 52](#) et [Capture des cibles deux à la page 56](#), passer immédiatement à l'étape de lavage pour éviter que les billes ne sèchent.
- Pendant les étapes de lavage, retirer tout l'éthanol à 80 % du fond des puits. L'éthanol résiduel peut avoir un impact sur les résultats.
- Pour des performances de test optimales, suivre le nombre de lavages indiqué dans le [Mode d'emploi à la page 36](#).
- Pendant la procédure [Normalisation des bibliothèques à la page 63](#), remettre en suspension le culot de library beads pour obtenir une densité de grappe constante sur la flow cell.
- Les bibliothèques d'ADN du même échantillon sont enrichies avec deux ensembles de sondes différents, mais utilisent le même index et doivent être séquencées sur la même flow cell.
- Les contrôles positifs et le contrôle sans modèle (NTC) doivent être traités comme un échantillon et divisés pour enrichissement avec les deux ensembles de sondes.

Notes de procédure

- Le flux de travail TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) peut être effectué selon le calendrier suivant :
 - Jour 1 : Fragmentation de l'ADN des échantillons d'ADNg, préparation de la bibliothèque et début de l'hybridation de nuit (première).
 - Jour 2 : Enrichissement, normalisation des bibliothèques enrichies et chargement des bibliothèques sur l'instrument NextSeq 550Dx.

S'il n'est pas possible d'exécuter le flux de travail TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) conformément à ce calendrier, plusieurs points d'arrêt de sécurité sont spécifiés tout au long du protocole. À moins qu'un point d'arrêt de sécurité ne soit spécifié dans le protocole, passer immédiatement à l'étape suivante.
- Les bibliothèques dérivées de l'ADN sont divisées en puits distincts pour un enrichissement simultané avec l'ensemble de sondes OPD2 et l'ensemble de sondes OPD3. Les contrôles positifs et les NTC doivent suivre la même procédure.
- Utiliser les composants de TruSight Oncology Comp Enrichment (réf. 20031123, réf. 20031121) avec l'OPD2 du TruSight Oncology Comp Content Set (réf. 20031122). Les bibliothèques enrichies en OPD2 sont appelées bibliothèques d'ADN.
- Utiliser les composants de TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (réf. 20140116, réf. 20140115) avec l'OPD3 du TruSight Oncology Comp HRD Content Set (réf. 20140117). Les bibliothèques enrichies en OPD3 sont appelées bibliothèques ADN HRD.
- Les tableaux de préparation du mélange maître comprennent le surplus de volume pour s'assurer qu'il y a suffisamment de volume pour le nombre d'échantillons traités.
- Utiliser de l'eau de qualité moléculaire exempte de nucléases.
- Après l'ajout du réactif, rincer l'embout en aspirant et en distribuant une fois dans le puits approprié de la plaque, sauf indication contraire dans la procédure.

- La température ambiante est définie entre 15 °C et 30 °C.
- Les réactifs, échantillons et bibliothèques doivent être conservés au froid à certaines étapes du mode d'emploi. Cela correspond à une conservation sur glace ou équivalent.

Programmes du thermocycleur

- Programmer les programmes du thermocycleur sur l'équipement de post-amplification avant de démarrer le protocole.
- S'assurer que les plaques PCR s'insèrent parfaitement dans le thermocycleur.
- Utiliser les plaques recommandées par le fabricant du thermocycleur.

Scellage et déscellement de la plaque

- Toujours sceller les plaques avec un nouveau joint de plaque adhésif. Ne pas réutiliser les joints.
- Pour sceller la plaque, appliquer solidement le couvercle adhésif sur la plaque à l'aide d'une cale ou d'un rouleau d'étanchéité.
- Toujours sceller la plaque à 96 puits avec un nouveau joint de plaque adhésif avant les étapes suivantes du protocole.
 - Étapes d'agitation de la plaque
 - Étapes de centrifugation
 - Étapes du cyclage thermique
 - Hybridations
 - Stockage à long terme
- S'assurer que les bords et les puits sont scellés pour réduire le risque de contamination croisée et d'évaporation.
- Placer la plaque sur une surface plane avant de retirer lentement le joint.
- Avant le décollement, si du liquide ou de la condensation est observé sur le joint ou les parois latérales des puits de la plaque, centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.
- Utiliser des joints de plaque adhésifs efficaces entre -20 °C et 100 °C, et adaptés aux plaques PCR à jupe ou jupe partielle.

Équipement

- S'assurer que le personnel du laboratoire est familiarisé avec les instructions du fabricant pour l'utilisation et l'entretien de tout l'équipement avant de commencer le test.

Type de plaque et transferts de plaque

- Un type de plaque approprié est nécessaire pour une performance et un stockage optimaux du test.

- Lors du transfert de volumes entre les plaques, transférer le volume spécifié de chaque puits d'une plaque vers le puits correspondant de la plaque de destination.
- Les pipettes multicanaux peuvent être utilisées lors du transfert d'échantillons entre des barrettes de tubes ou des plaques.
- Suivre les directives suivantes lors de l'agitation des plaques.
 - Utiliser un agitateur pour plaques pour agiter les plaques. Ne pas mélanger les plaques à l'aide d'un vortex.
 - Agiter les plaques PCR à 1 200 tr/min.
 - Agiter les plaques MIDI à 1 800 tr/min.
 - Suivre les instructions du fabricant pour s'assurer que l'agitateur de plaque maintient fermement la plaque.

Centrifugation

- Lorsque les instructions du protocole indiquent de centrifuger brièvement, centrifuger à $280 \times g$ pendant 1 minute.
- Si du liquide est observé sur le joint ou sur les côtés d'un puits, centrifuger la plaque à $280 \times g$ pendant 1 minute.

Manipulation des réactifs

- Reboucher hermétiquement tous les tubes de réactif immédiatement après utilisation pour limiter l'évaporation et éviter toute contamination.
- Ramener les réactifs à la température de stockage spécifiée lorsqu'ils ne sont plus nécessaires pour une procédure.
- Suivre la préparation du réactif qui précède chaque section de procédure du [Mode d'emploi à la page 36](#).
- S'assurer de préparer le volume requis de mélange maître, de mélange d'élution et d'éthanol à 80 % pour le nombre d'échantillons que vous traitez.
- Les volumes fournis dans les tableaux de mélange maître et de solution contiennent un excédent. Les calculs de volume excédentaire sont les suivants.
 - [Tableau 13](#)
 - Volume d'ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,20)$.
 - Volume d'ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,20)$.
 - [Tableau 23](#)
 - Volume d'EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,364)$.
 - Volume de HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,364)$.
 - [Tableau 24](#)
 - Volume d'EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,364)$.

- Volume de HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,364)$.
- [Tableau 30](#)
 - Volume de LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (2,0)$.
 - Volume de LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (2,0)$.
- [Tableau 31](#)
 - Volume d'EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,25)$.
 - Volume de HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{nombre de bibliothèques}) \times (1,25)$.

Jeux d'adaptateurs

- Utiliser uniquement des adaptateurs UMI.
- Des adaptateurs SUA1 sont fournis, mais ne sont pas nécessaires pour le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Manipulation des billes

- Trois types de billes sont inclus dans le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) (SPB, SMB et LNB1). S'assurer que le bon type de bille est utilisé pendant la procédure.
- Effectuer le nombre correct de lavages pour chaque type de bille.
- S'assurer que les billes sont à température ambiante avant utilisation.
- Mélanger les billes pendant 1 minute avant utilisation pour garantir l'homogénéité.
- Suivre les directives suivantes lors du mélange des billes avec une pipette :
 - Utiliser une pipette et une taille d'embout adaptées au volume que vous mélangez.
 - Régler le volume à environ 50 à 75 % du volume de l'échantillon.
 - Pipeter lentement sans relâcher le piston.
 - Éviter les éclaboussures et l'introduction de bulles.
 - Positionner l'embout de la pipette au-dessus du culot et le distribuer directement dans le culot pour libérer les billes du puits ou du tube.
 - S'assurer que le culot de billes est complètement en solution. La solution doit avoir un aspect marron foncé et avoir une consistance homogène.
 - Évaluer si un culot de billes est présent. Aspirer avec précaution la solution de billes totales du puits dans l'embout et examiner le fond des puits.
- Si des billes sont aspirées dans les embouts de pipette pendant les étapes de séparation magnétique, les distribuer à nouveau dans le puits de la plaque sur le support magnétique. Attendre que le liquide soit clair (environ 2 minutes) avant de passer à l'étape suivante de la procédure.
- Lors du lavage des billes :
 - Utiliser le support magnétique recommandé pour la plaque.

- Distribuer le liquide directement sur le culot de billes afin que les billes sur le côté des puits soient mouillées.
- Maintenir la plaque sur le support magnétique jusqu'à ce que la procédure indique de la retirer.
- Ne pas agiter la plaque sur le support magnétique.
- Sur le support magnétique, ne pas déranger le culot de billes.
- Lors du lavage des billes ou du retrait du surnageant, incliner les embouts de pipette au fond des puits pour éviter de créer un vide et d'extraire la solution dans les filtres d'embouts de pipette.

Nombre de bibliothèques et sélection des index

Avant la configuration de l'analyse, planifier le nombre de bibliothèques d'échantillons et d'index d'échantillons pour l'analyse de séquençage. Les directives suivantes concernant le nombre d'échantillons comprennent les contrôles positifs, mais excluent les NTC. Les NTC doivent être ajoutés à l'analyse prévue en tant qu'échantillon supplémentaire.

Les primers d'indexation identifient de manière unique chaque échantillon afin que les bibliothèques puissent être regroupées pour le séquençage sur une flow cell. Les index s'affichent sur l'écran Create Run (Créer une analyse) pendant la configuration de l'analyse sur le module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Pendant la préparation de la bibliothèque, ajouter le primer d'indexation à chaque bibliothèque d'échantillons. *Utiliser un mélange de primers d'indexation différent pour chaque bibliothèque d'échantillons.*

Les bibliothèques indexées du même échantillon sont divisées en deux enrichissements avec deux ensembles de sondes différents. Les deux bibliothèques enrichies qui en résultent partagent le même index et doivent être séquencées sur la même flow cell.

Consulter le [Tableau 4](#) pour connaître les bibliothèques minimales et maximales à séquencer sur une flow cell lors du séquençage.

Tableau 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Séquençage

Type de bibliothèque	Enrichissement	Minimum*	Maximum*
ADN	OPD2	3	8
ADN HRD	OPD3	3	8

* Les NTC ne contribuent pas à la plexité.

Pour une utilisation optimale des réactifs lors du séquençage sur l'instrument NextSeq 550Dx, séquencer 8 bibliothèques d'ADN (OPD2) et 8 bibliothèques d'ARN HRD (OPD3) par flow cell.

S'assurer que les primers d'indexation que vous utilisez avec les échantillons correspondent aux index que vous sélectionnez pour l'analyse avec le module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). *Les mauvaises correspondances entraînent des résultats erronés en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon.*

Il existe deux types d'index (UPxx and CPxx) dans le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Lors du séquençage du nombre minimum de bibliothèques (3 bibliothèques d'ADN et 3 bibliothèques d'ADN HRD), les exigences suivantes s'appliquent :

- Ne pas utiliser les ensembles d'index CPxx.
- L'un des ensembles d'index UPxx suivants est nécessaire pour fournir une diversité suffisante :
 - UP01, UP02 et UP03
 - UP04, UP05 et UP06
 - UP07, UP08 et UP09
 - UP10, UP11 et UP12

Par exemple, la première bibliothèque se voit attribuer UP01, la deuxième bibliothèque UP02 et la troisième bibliothèque UP03.

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) nécessite le TruSight Oncology DNA Control v2 comme contrôle positif. Inclure le TruSight Oncology DNA Control v2 pour chaque analyse de séquençage d'ADN dans un événement de préparation de bibliothèque donné. Un contrôle positif unique est préparé pour chaque série de séquençage planifiée. Pour en savoir plus, consulter la Notice TruSight Oncology DNA Control v2 (EU).

La quantité de TruSight Oncology DNA Control v2 est de 2 µl.

Inclure le NTC dans chaque événement de préparation de la bibliothèque. Le NTC est séquencé plusieurs fois dans un événement de préparation de bibliothèque. Suivre ces directives pour le contrôle positif et le NTC :

- Préparer les bibliothèques à partir de contrôles positifs et NTC de la même manière que les échantillons. Le contrôle positif et le NTC doivent être divisés pour enrichissement avec les deux ensembles de sondes de la même manière que les échantillons.
- Utiliser TEB pour le NTC ADN.
- Les contrôles positifs sont inclus dans l'exigence de bibliothèque maximale.
- Les NTC ne sont pas inclus dans les exigences minimales de la bibliothèque.
- Utiliser les index UP pour le NTC lors du séquençage du nombre minimum de bibliothèques.
- Comme le NTC est séquencé à plusieurs reprises, l'index sélectionné pour ce contrôle ne peut pas être répété dans l'événement de préparation de la bibliothèque.

Les tableaux suivants montrent des exemples de disposition des plaques pour la préparation de la bibliothèque ([Figure 1](#)). Chaque colonne numérotée représente une seule série de séquençage. Le NTC est séquencé pour chaque colonne ou ensemble de colonnes.

Tableau 5 Plaque de préparation de bibliothèque d'une série unique comprenant six échantillons de patients

	1	2	3	4	5	6
A	Contrôle de l'ADN Pos	vide	vide	vide	vide	vide
B	ADN 1	vide	vide	vide	vide	vide
C	ADN 2	vide	vide	vide	vide	vide
D	ADN 3	vide	vide	vide	vide	vide
E	ADN 4	vide	vide	vide	vide	vide
F	ADN 5	vide	vide	vide	vide	vide
G	ADN 6	vide	vide	vide	vide	vide
H	ADN NTC	vide	vide	vide	vide	vide

Tableau 6 Plaque de préparation de la bibliothèque de trois séries comprenant 20 échantillons de patients

	1	2	3	4	5	6	7
A	Contrôle de l'ADN Pos	Contrôle de l'ADN Pos	Contrôle de l'ADN Pos	vide	vide	vide	vide
B	ADN 1	ADN 7	ADN 14	vide	vide	vide	vide
C	ADN 2	ADN 8	ADN 15	vide	vide	vide	vide
D	ADN 3	ADN 9	ADN 16	vide	vide	vide	vide
E	ADN 4	ADN 10	ADN 17	vide	vide	vide	vide
F	ADN 5	ADN 11	ADN 18	vide	vide	vide	vide
G	ADN 6	ADN 12	ADN 19	vide	vide	vide	vide
H	ADN NTC	ADN 13	ADN 20	vide	vide	vide	vide

Mode d'emploi

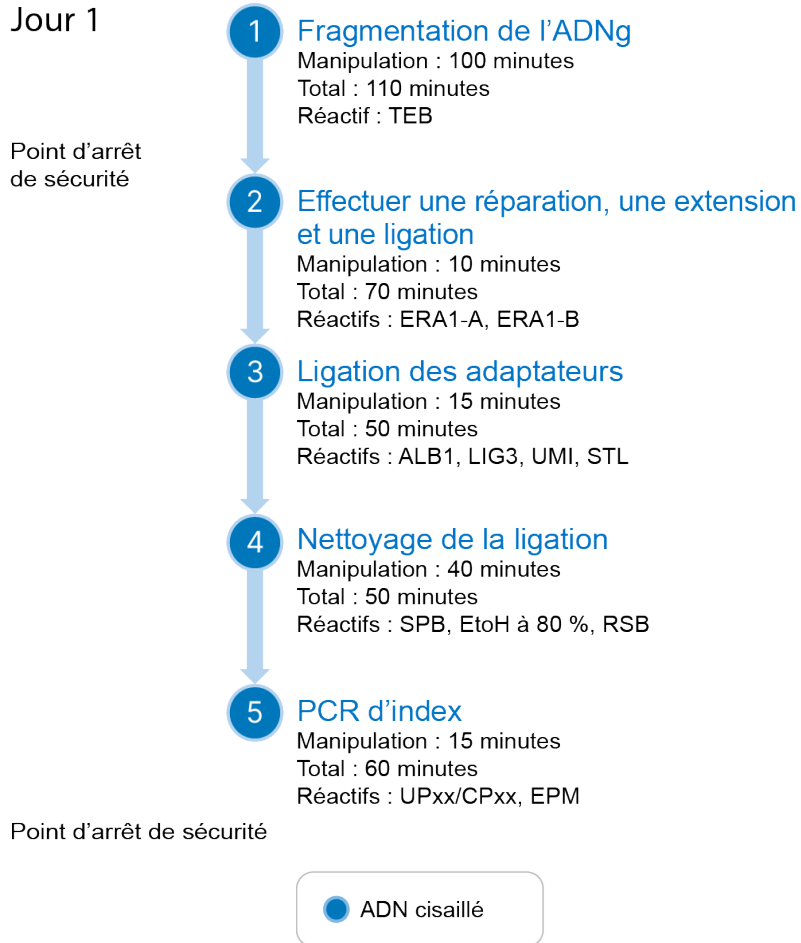
Une vue d'ensemble du flux de travail TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est présentée à la [Figure 1](#) et à la [Figure 2](#).

Flux de travail de préparation de la bibliothèque

La [Figure 1](#) illustre le flux de travail de préparation de la bibliothèque pour TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Les contrôles positifs et NTC sont traités de la même manière que les échantillons. Les points d'arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes.

Avant de démarrer le protocole, saisir les informations relatives à l'analyse et à l'échantillon dans le module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Consulter le *Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (document n° 200080937).

Figure 1 Flux de travail TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) (Partie 1)

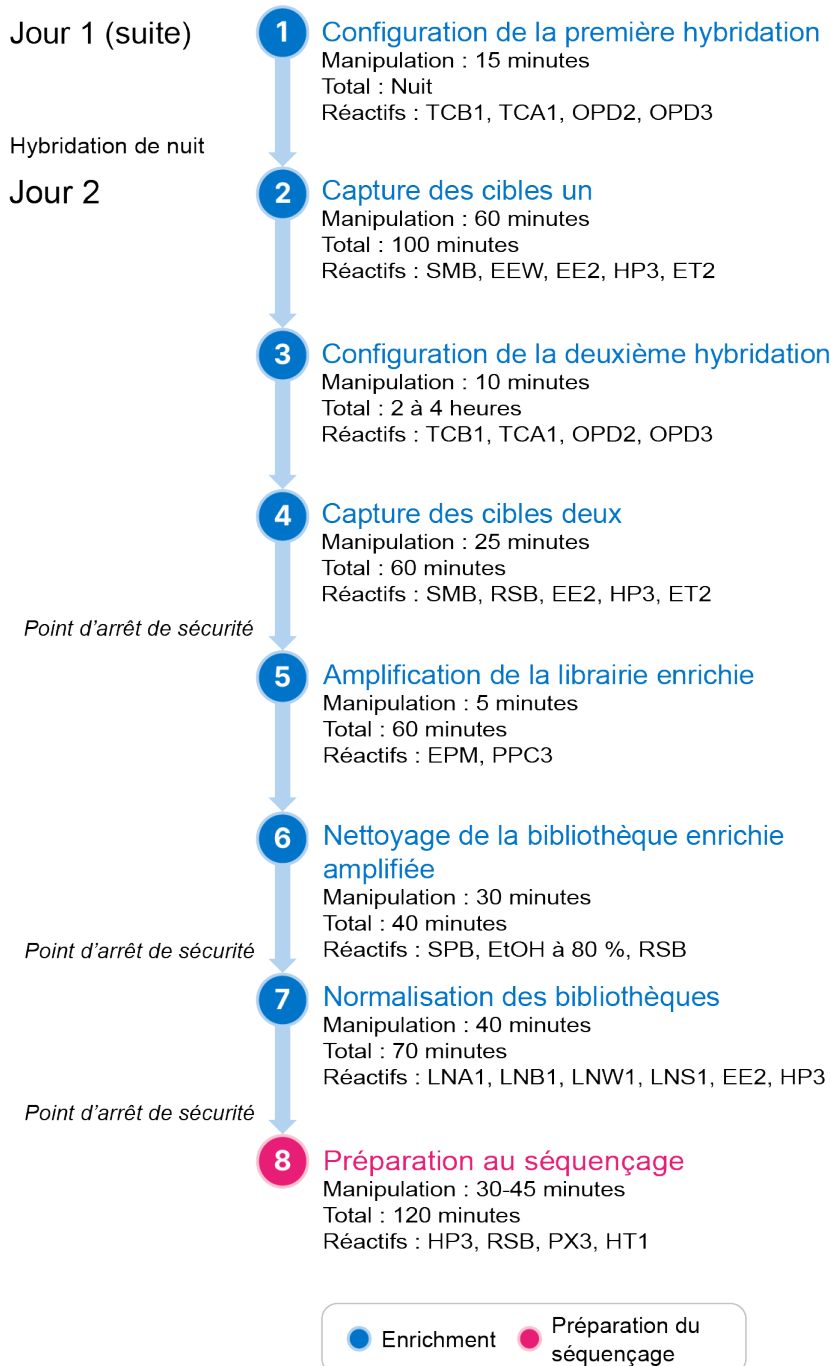


* Les temps de manipulation et les temps totaux sont approximatifs.

Flux de travail d'enrichissement

La [Figure 2](#) illustre le flux de travail d'enrichissement. Les points d'arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes.

Figure 2 Flux de travail TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) (Partie 2)



Programmation des thermocycleurs

Avant de démarrer le test, enregistrer les programmes suivants sur les thermocycleurs après amplification.

Tableau 7 Programmes du thermocycleur post-amplification

Étape de la procédure	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres du thermocycleur
Indexation PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C pendant 30 secondes • 15 cycles de : • 98 °C pendant 10 secondes • 60 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 5 minutes • Maintenir à 10 °C
Effectuer la première hybridation	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C pendant 10 minutes • 85 °C pendant 2 min 30 secondes • 75 °C pendant 2 min 30 secondes • 65 °C pendant 2 min 30 secondes • Maintenir à 57 °C pendant 8 à 24 heures
Effectuer une deuxième hybridation	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C pendant 10 minutes • 85 °C pendant 2 min 30 secondes • 75 °C pendant 2 min 30 secondes • 65 °C pendant 2 min 30 secondes • Maintenir à 57 °C pendant 1,5 à 4 heures
Amplifier la bibliothèque enrichie	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C pendant 30 secondes • 18 cycles de : • 98 °C pendant 10 secondes • 60 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 5 minutes • Maintenir à 10 °C

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.



ATTENTION

Toutes les procédures du flux de travail nécessitent un environnement sans RNase/DNase.

1. Décontaminer soigneusement les zones de travail avec un nettoyant inhibant la RNase/DNase.
2. Suivre les instructions du fabricant pour installer l'appareil à ultrasons.
3. Retirer les contrôles ADN du stockage.
4. Retirer le tube de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TEB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Fragmentation de l'ADNg

Fragmentation de l'ADNg

Ce processus fragmente l'ADNg et génère des fragments d'ADNdb avec des débords de 3' ou 5'.

Préparation

1. Suivre les recommandations de la section [Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques à la page 23](#) pour quantifier les échantillons.
2. Préparer TEB : Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger.

Procédure

Préparation de la plaque

1. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits LP (Préparation de la bibliothèque).
Si vous vous arrêtez au [POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ à la page 41](#), utilisez une plaque PCR.
2. Couvrir et mettre de côté pour l'étape [Transférer l'ADN fragmenté à la page 41](#).

Diluer l'ADNg

1. Décongeler les échantillons d'ADNg et les contrôles d'ADN à température ambiante.
2. Pipeter chaque échantillon d'ADNg 10 fois pour mélanger.
3. Centrifuger brièvement le tube pour recueillir les gouttelettes.
4. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le TEB.
5. Utiliser le TEB pour préparer chaque échantillon d'ADNg dans un volume final de 52 µl. Consulter le tableau suivant pour connaître les quantités d'entrée et les concentrations minimales en fonction du type d'échantillon.
 - Le test nécessite une concentration d'extraction minimale pour permettre au moins 40 µl de TEB du volume de 52 µl.
 - Pour le contrôle de l'ADN, utiliser 2 µl dans un volume final de 52 µl.
 - Pour éviter la perte d'échantillon, ne pas pipeter moins de 2 µl d'échantillon dans cette dilution.

Type d'échantillon	Montant d'entrée (ng)	Concentration minimale (ng/μl)
FFPE	40	3.33
Contrôle	40	20

Fragment

1. Ajouter 52 μl de chaque échantillon d'ADNg dans un puits séparé du tube à ultrasons.



ATTENTION

Charger lentement l'ADNg dans le tube, en s'assurant qu'il n'y a pas d'espace d'air au fond du tube. Pour plus d'informations, consulter la section [Test à la page 27](#) et les instructions du fabricant.

2. Noter l'orientation de la bandelette.
3. Fragmenter l'ADNg à l'aide de l'appareil à ultrasons.

Transférer l'ADN fragmenté

1. S'assurer que la disposition et les index de la plaque d'échantillon pour chaque échantillon correspondent à l'analyse sélectionnée pour l'analyse avec le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN).
2. Suivre les instructions du fabricant de l'appareil à ultrasons pour récupérer l'échantillon. Pour certains types de tubes à ultrasons, une centrifugation est nécessaire pour consolider l'échantillon dans le tube.
3. Pour chaque échantillon d'ADNg fragmenté, utiliser une pipette à embouts fins pour effectuer trois transferts de 16,7 μl dans un puits vide de la plaque LP.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, appliquer un joint adhésif sur la plaque de LP PCR et centrifuger à 280 × g pendant 1 minute. À conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr. S'assurer que les programmes du thermocycleur post-amplification sont définis. Consulter la section [Programmation des thermocycleurs à la page 39](#).

1. Préparer un seau à glace ou équivalent.
2. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) (réf. 20031118)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
ERA1-A	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Effectuer une réparation, une extension et une ligation
ERA1-B	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Effectuer une réparation, une extension et une ligation
ALB1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
LIG3	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Ligation des adaptateurs
UMI (bouchon blanc)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
STL	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
EPM	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Indexation PCR

Tableau 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de la ligation
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de la ligation

Tableau 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (réf. 20031120)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
UPxx	-25 °C à -15 °C	Décongeler les tubes de primer d'indexation appropriés à température ambiante.	Indexation PCR

Tableau 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (réf. 20031126)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
CPxx	-25 °C à -15 °C	Décongeler les tubes de primer d'indexation appropriés à température ambiante.	Indexation PCR

Effectuer une réparation, une extension et une ligation

Ce processus répare les surplombs résultant de la fragmentation en extrémités avec des queues en A en surplomb à l'aide d'un mélange maître d'end repair A-tailing (ERA1).

L'activité exonucléase de 3' à 5' de ce mélange élimine les surplombs de 3' et l'activité polymérase de 5' à 3' remplit les surplombs de 5'. Les extrémités de 3' subissent une polyadénylation pendant cette réaction pour les empêcher de se ligaturer les unes les autres pendant la réaction de ligation de l'adaptateur.

Préparation

- Préchauffer 2 incubateurs à micro-échantillons avec inserts de bloc thermique MIDI comme suit.
 - Préchauffer un incubateur de micro-échantillons à 30 °C.
 - Préchauffer un incubateur de micro-échantillons à 72 °C.
- Préparer les réactifs suivants.
 - ERA1-A : Centrifuger brièvement, puis pipeter pour mélanger. Garder au froid.
 - ERA1-B : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Vérifier la présence de précipités. Le cas échéant, réchauffer le tube à 37 °C, puis pipeter pour mélanger jusqu'à dissolution des précipités.
- Préparer le mélange maître ERA1 dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 13 Mélange maître ERA1*

Composant du mélange maître	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section [Manipulation des réactifs à la page 31](#) pour les calculs.

- Pipeter lentement 10 fois pour garantir l'homogénéité, puis centrifuger brièvement. Garder le mélange maître ERA1 au froid.
- Pour préparer la plaque, sélectionner l'une des options suivantes :
 - Si les échantillons sont dans une plaque MIDI, la préparer comme suit.

- a. Réétiqueter la plaque MIDI LP2 (Préparation de la bibliothèque 2).
- b. Si certains échantillons se trouvent dans des plaques MIDI séparées, déplacer tous les échantillons vers des puits séparés de la même plaque MIDI selon la disposition de la plaque.
- Si la plaque est congelée, la préparer comme suit.
 - a. Décongeler la plaque LP PCR à température ambiante.
 - b. Centrifuger la plaque à $280 \times g$ pendant 1 minute.
 - c. Pipeter 10 fois pour mélanger.
 - d. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits LP2 (Préparation de la bibliothèque 2).
 - e. Transférer la totalité des 50 µl de chaque échantillon de la plaque LP PCR dans le puits correspondant de la plaque LP2 MIDI.
 - f. Jeter la plaque LP PCR.

Procédure

1. Ajouter 10 µl de mélange maître ERA1 dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
2. Jeter le mélange maître ERA1 restant.
3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
4. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
5. Incuber dans l'incubateur de micro-échantillons préchauffé à 30 °C pendant 30 minutes.
6. Transférer immédiatement dans un deuxième incubateur à micro-échantillons préchauffé.
7. Incuber à 72 °C pendant 20 minutes.
8. Garder la plaque LP2 MIDI au froid pendant 5 minutes.

Ligation des adaptateurs

Ce processus ligue les adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADNg.

Préparation



ATTENTION

Utiliser uniquement des adaptateurs UMI. Des adaptateurs SUA1 sont fournis, mais ne sont pas nécessaires pour le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

1. Préparer les réactifs suivants.
 - ALB1 : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant au moins 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
 - LIG3 : Centrifuger brièvement, puis pipeter pour mélanger. Garder au froid.
 - UMI : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant au moins 10 secondes, puis centrifuger brièvement.

- STL : Mettre de côté pour une utilisation dans la procédure.

Procédure

1. Retirer la plaque LP2 MIDI de la glace ou équivalent.
2. Ajouter 60 µl ALB1 dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI. ALB1 est une solution visqueuse. Pipeter lentement pour minimiser la formation de bulles.
3. Ajouter 5 µl LIG3 dans chaque puits d'échantillon.
4. Ajouter 10 µl UMI (bouchon blanc) dans chaque puits d'échantillon.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
8. Mélanger STL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
9. Ajouter 5 µl d'STL dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
10. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
11. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.

Nettoyage de la ligation

Ce processus utilise du SPB pour purifier les fragments d'ADNg ligaturés par adaptateur et élimine les produits indésirables. Les billes sont lavées deux fois avec de l'éthanol frais à 80 %. Les échantillons ligaturés par adaptateur sont élués avec du RSB.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
 - SPB : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
 - RSB : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
2. Préparer l'EtOH frais à 80 % dans un tube conique de 15 ml ou 50 ml.

Tableau 14 Préparer de l'éthanol frais à 80 %

Réactif	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques
100 % EtOH, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Eau exempte de RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Mélanger l'EtOH frais à 80 % à l'aide d'un vortex.
4. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Mélanger SPB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
2. Ajouter immédiatement 112 µl de SPB dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SPB, inclure un facteur de dépassement de 1,15 lors de l'aliquotage d'une quantité suffisante de matériel par échantillon. Jeter tout matériel restant après l'ajout du SPB dans chaque puits d'échantillon.
3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
4. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
5. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Placer la plaque LP2 MIDI sur le support magnétique pendant 10 minutes.
7. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits d'échantillon.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
 - a. Conserver la plaque LP2 MIDI sur le support magnétique et ajouter 200 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque puits d'échantillon.
 - b. Patienter 30 secondes.
 - c. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits d'échantillon.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EtOH résiduel de chaque puits.
4. Jeter l'EtOH à 80 % non utilisé.

Éluer

1. Retirer la plaque LP2 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 27,5 µl de RSB à chaque puits d'échantillon.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
6. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
7. Placer la plaque LP2 MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.

8. Étiqueter une nouvelle plaque de PCR à 96 puits LS (échantillons de la bibliothèque).
9. Transférer 25 µl de chaque éluat de la plaque LP2 MIDI dans le puits correspondant de la plaque LS PCR.
10. Jeter la plaque LP2 MIDI vide.

Indexation PCR

Dans cette étape, les fragments de bibliothèque sont amplifiés à l'aide de primers qui ajoutent des séquences d'index pour le multiplexage des échantillons. Le produit obtenu contient la bibliothèque complète de fragments d'ADN encadrés par les adaptateurs requis pour la génération de clusters.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
 - EPM : Garder au froid.
 - UPxx : Mélanger à l'aide d'un vortex et centrifuger brièvement.
 - CPxx : Mélanger à l'aide d'un vortex et centrifuger brièvement.
2. S'assurer que les index de chaque échantillon correspondent à l'analyse prévue sur le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) pendant la configuration de l'analyse. Assurez-vous de suivre les instructions concernant la sélection de l'index dans la section [Nombre de bibliothèques et sélection des index à la page 33](#).



ATTENTION

Les mauvaises correspondances entre les échantillons et les primers d'indexation entraînent des résultats erronés en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon.

Procédure

1. Ajouter 5 µl du primer d'indexation approprié (UPxx ou CPxx) au puits d'échantillon correspondant dans la plaque de LS PCR en fonction des index sélectionnés.



ATTENTION

Manipuler et ouvrir un seul tube de primer d'indexation à la fois. Reboucher chaque tube index avec un nouveau bouchon immédiatement après utilisation. Ne pas combiner les primers d'indexation.

2. Mélanger l'EPM à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter 20 µl d'EPM dans chaque puits d'échantillon.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LS PCR.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
5. Agiter à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
6. Remettre les réactifs de pré-amplification en stockage.



ATTENTION

Effectuer toutes les étapes suivantes dans une zone post-amplification pour éviter le transfert du produit d'amplification.

7. Centrifuger la plaque LS PCR à 280 × g pendant 1 minute.
8. Placer sur le thermocycleur post-amplification préprogrammé et exécuter le programme I-PCR.
Consulter la section [Programmation des thermocycleurs à la page 39](#).
Si vous poursuivez avec [Configuration de la première hybridation à la page 49](#), suivez les instructions de décongélation pour les réactifs dans les Étapes de préparation du protocole.
9. Une fois le programme I-PCR terminé, centrifuger la plaque LS PCR à 280 × g pendant 1 minute.
10. Réétiqueter la plaque d'échantillons de bibliothèque amplifiée, ALS (Échantillons de bibliothèques amplifiées).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, conserver la plaque ALS PCR entre -25 °C et -15 °C pendant 30 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant à l'hybridation de nuit.

1. S'assurer que les programmes du thermocycleur post-amplification sont définis. Consulter la section [Programmation des thermocycleurs à la page 39](#).
2. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20031123) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20140116)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TCB1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (réf. 20031121) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (réf. 20140115)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TCA1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (réf. 20031122)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPD2 (bouchon blanc)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set Box (réf. 20140117)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPD3 (bouchon bleu)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Configuration de la première hybridation

Au cours de ce processus, deux groupes d'oligonucléotides (OPD2 et OPD3) s'hybrident aux bibliothèques d'ADNg préparées dans la section [Indexation PCR à la page 47](#). L'enrichissement des régions ciblées nécessite deux étapes d'hybridation. Lors de la première hybridation, les oligonucléotides s'hybrident aux bibliothèques d'ADNg pendant la nuit (8 heures à 24 heures).

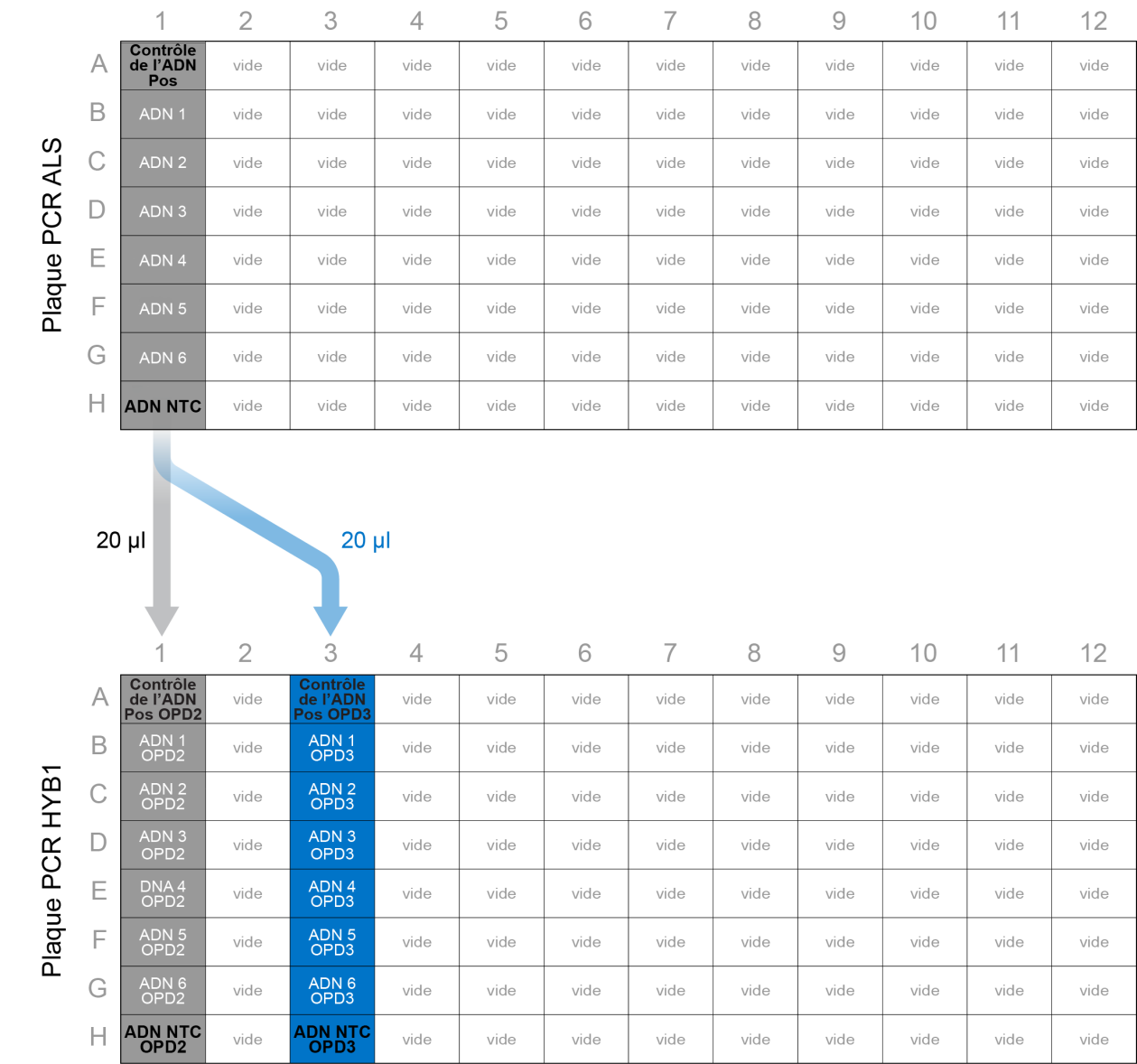
Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
 - TCB1 : Chauffer le tube à 37 °C pendant 5 minutes. Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
 - TCA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - OPD2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - OPD3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
2. Si la plaque ALS PCR a été conservée, décongeler à température ambiante et centrifuger à 280 × g pendant 1 minute. Pipeter pour mélanger.
3. Étiqueter une nouvelle plaque PCR 96 puits HYB1 (Hybridation 1).

Procédure

1. Transférer 20 µl de chaque bibliothèque d'ADNg de la plaque ALS PCR dans le puits correspondant de la plaque HYB1 PCR pour l'enrichissement à l'aide de sondes OPD2. Inclure les contrôles positifs et les NTC pour l'enrichissement avec les sondes OPD2.
2. Transférer une bibliothèque d'ADNg supplémentaire de 20 µl de la plaque PCR ALS dans un deuxième puits de la plaque PCR HYB1 pour enrichissement avec des sondes OPD3, comme indiqué dans la [Figure 3](#). Inclure les contrôles positifs et les NTC pour l'enrichissement avec les sondes OPD3.

Figure 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Exemple de disposition de plaque pour la première hybridation



3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ALS PCR et la mettre de côté.

Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.

4. Vérifier la présence de précipités dans TCB1. Le cas échéant, réchauffer le tube et le mélanger à l'aide d'un vortex jusqu'à ce que les cristaux se dissolvent.
5. Ajouter 15 µl de TCB1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque HYB1 PCR.
6. Ajouter 10 µl de TCA1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque HYB1 PCR.
7. Ajouter des sondes.
Ne *pas* combiner différents types de sondes. Ajouter un seul ensemble de sondes par puits.
 - **[Puits de bibliothèque d'ADN]** : Ajouter 5 µl d'OPD2 (bouchon blanc) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ADN.
 - **[Puits de bibliothèque d'ADN HRD]** : Ajouter 5 µl d'OPD3 (bouchon blanc) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ADN pour l'enrichissement HRD.
8. Appliquer un joint adhésif sur la plaque HYB1 PCR.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
9. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
10. Placer sur le thermocycleur et exécuter le programme HYB1.
Consulter la section [Programmation des thermocycleurs à la page 39](#).
11. Hybrider à 57 °C pendant un minimum de 8 heures à un maximum de 24 heures.
12. Remettre les réactifs d'hybridation en stockage.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

Au début du Jour 2, retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20031123) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20140116)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SMB (étiquette bleu foncé)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Capture des cibles un Capture des cibles deux
ET2	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Capture des cibles un Capture des cibles deux
HP3	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Capture des cibles un Capture des cibles deux Normalisation des bibliothèques
TCB1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Capture des cibles deux Nettoyage de la librairie enrichie amplifiée

Tableau 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (réf. 20031121) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (réf. 20140115)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
EE2	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Capture des cibles un Capture des cibles deux Normalisation des bibliothèques
EEW	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Capture des cibles un
TCA1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Tableau 21 TruSight Oncology Comp Content Set Box (réf. 20031122)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPD2 (bouchon blanc)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Tableau 22 TruSight Oncology Comp HRD Content Box (réf. 20140117)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPD3 (bouchon bleu)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Capture des cibles un

Cette étape utilise du SMB pour capturer des sondes hybridées aux régions d'intérêt ciblées. Les billes sont lavées trois fois avec EEW. Les bibliothèques enrichies sont éluées à l'aide d'un mélange d'élution EE2 + HP3 frais et neutralisées avec de l'ET2.

Préparation

1. Préchauffer un incubateur de micro-échantillons avec un bloc chauffant MIDI à 57 °C.

2. Préparer les réactifs suivants.
 - EEW : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 1 minute.
 - EE2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - HP3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - SMB : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes. S'assurer d'utiliser **SMB**, et non SPB, pour cette procédure.
 - ET2 : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
3. Préparer le mélange d'élution EE2 + HP3 frais dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 23 Mélange d'élution EE2 + HP3 pour la capture des cibles un*

Composant de mélange d'élution	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section [Manipulation des réactifs à la page 31](#) pour les calculs.

4. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Mettre de côté pour l'étape [Éluer à la page 54](#).
5. Étiqueter une nouvelle plaque CAP1 MIDI à 96 puits (Capture 1).
6. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Retirer la plaque HYB1 PCR du thermocycleur.
2. Centrifuger la plaque HYB1 PCR à 280 × g pendant 1 minute.
3. Mélanger SMB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension. En présence de précipité ou de culot de billes, veiller à atteindre la température ambiante, pipeter de haut en bas pour libérer le culot, puis mélanger à l'aide d'un vortex pour remettre en suspension.
4. Ajouter immédiatement 150 µl de SMB à chaque puits de bibliothèque de la plaque CAP1 MIDI. Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SMB, incluez un facteur d'excédent de 1,05 lors de l'aliquotage afin d'avoir une quantité suffisante de matériel par échantillon.
5. Jeter tout matériel restant après avoir ajouté SMB à chaque puits d'échantillon.
6. Régler la pipette sur 50 µl et transférer le volume entier de chaque bibliothèque de la plaque HYB1 PCR dans le puits correspondant de la plaque CAP1 MIDI.
7. Jeter la plaque HYB1 PCR vide.
8. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP1 MIDI.

Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.

9. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
10. Incuber dans l'incubateur à micro-échantillons préchauffé à 57 °C pendant 25 minutes.
11. Placer la plaque CAP1 MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
12. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.



ATTENTION

Passer immédiatement à l'étape suivante ([Laver à la page 54](#)). Ne pas laisser reposer le culot de billes pendant une durée prolongée sans liquide.

Laver

1. Laver les billes comme suit.
 - a. Retirer la plaque CAP1 MIDI du support magnétique.
 - b. Ajouter 200 µl d'EEW dans chaque puits.
 - c. Utiliser une pipette réglée sur 150 µl et pipeter au moins 10 fois pour mélanger. S'assurer que toutes les billes sont remises en suspension.
S'assurer qu'aucune pastille de billes n'est présente en aspirant soigneusement la solution de billes totales du puits dans l'embout. Inspecter visuellement le fond de chaque puits. Si un culot de billes est présent, incliner l'embout de la pipette vers le culot pendant les étapes de lavage pour le déloger. S'assurer que le culot de billes est complètement immergé dans la solution. La solution doit avoir un aspect marron foncé et avoir une consistance homogène.
 - d. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP1 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
 - e. Agiter à 1 800 tr/min pendant 4 minutes.
 - f. Incuber dans un incubateur de micro-échantillons à 57 °C pendant 5 minutes.
 - g. Placer la plaque CAP1 MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
 - h. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Laver les billes une **troisième** fois.
4. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EEW résiduel de chaque puits.

Éluer

1. Retirer la plaque CAP1 MIDI du support magnétique.
2. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

3. Ajouter avec précaution 17 µl de mélange d'élution EE2 + HP3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque CAP1 MIDI.
4. Jeter le mélange d'élution EE2 + HP3 restant.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP1 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque de PCR à 96 puits ELU1 (Elution 1).
9. Mélanger l'ET2 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
10. Ajouter 5 µl d'ET2 à chaque puits de bibliothèque correspondant dans la nouvelle plaque ELU1 PCR.
11. Transférer avec précaution 15 µl d'éluat de chaque puits de bibliothèque de la plaque CAP1 MIDI dans le puits correspondant de la plaque ELU1 PCR.
12. Jeter la plaque CAP1 MIDI vide.
13. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU1 PCR.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
14. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
15. Remettre les EEW au stockage.

Configuration de la deuxième hybridation

Cette étape lie les régions ciblées des bibliothèques d'ADNg enrichies avec des sondes de capture une deuxième fois. La deuxième hybridation garantit une spécificité élevée des régions capturées. Pour assurer un enrichissement optimal des bibliothèques, effectuer la deuxième étape d'hybridation à 57 °C pendant un minimum de 1,5 heure à un maximum de 4 heures.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
 - TCB1 : Chauffer le tube à 37 °C pendant 5 minutes. Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
 - TCA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - OPD2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - OPD3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

Procédure

1. Inspecter le TCB1 à la recherche de précipités. Le cas échéant, réchauffer le tube et mélanger à l'aide d'un vortex jusqu'à ce que les cristaux se dissolvent.
2. Ajouter 15 µl de TCB1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque ELU1 PCR.

3. Ajouter 10 µl de TCA1 à chaque puits de la bibliothèque.
4. Ajouter à chaque puits la même sonde utilisée lors de la première hybridation. Ajouter un seul ensemble de sondes par puits.
Ne *pas* combiner différents types de sondes.
 - **[Puits de bibliothèque d'ADN]** : Ajouter 5 µl d'OPD2 (bouchon blanc) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ADN.
 - **[Puits de bibliothèque d'ADN HRD]** : Ajouter 5 µl d'OPD3 (bouchon blanc) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ADN pour l'enrichissement HRD.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU1 PCR.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
6. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un thermocycleur et exécuter le programme HYB2.
Consulter la section [Programmation des thermocycleurs à la page 39](#).
8. Hybrider à 57 °C pendant un minimum de 1,5 heure à un maximum de 4 heures.
9. Remettre les réactifs d'hybridation en stockage.

Capture des cibles deux

Cette étape utilise du SMB pour capturer des sondes hybridées aux régions d'intérêt ciblées. Les billes sont lavées une fois avec du RSB. Les bibliothèques enrichies sont éluées à l'aide d'un mélange d'élution EE2 + HP3 frais et neutralisées avec de l'ET2.

Préparation

1. Préchauffer un incubateur de micro-échantillons avec un bloc chauffant MIDI à 57 °C.
2. Préparer les réactifs suivants.
 - EE2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - HP3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - SMB : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
S'assurer d'utiliser **SMB**, et non SPB, pour cette procédure.
 - RSB : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
 - ET2 : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
3. Préparer le mélange d'élution EE2 + HP3 frais dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 24 Mélange d'élution EE2 + HP3 pour la capture des cibles deux*

Composant de mélange d'élution	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section [Manipulation des réactifs à la page 31](#) pour les calculs.

- Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Mettre de côté pour l'étape [Éluer à la page 58](#).
- Étiqueter une nouvelle plaque MIDI CAP2 à 96 puits (capture 2).
- Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

- Retirer la plaque ELU1 PCR du thermocycleur.
- Centrifuger la plaque ELU1 PCR à 280 × g pendant 1 minute.
- Mélanger SMB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
- Ajouter immédiatement 150 µl SMB à chaque puits de la bibliothèque de la plaque CAP2 MIDI.
Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SMB, incluez un facteur d'excédent de 1,05 lors de l'aliquotage afin d'avoir une quantité suffisante de matériel par échantillon.
- Jeter tout matériel restant après avoir ajouté SMB à chaque puits d'échantillon.
- Régler la pipette sur 50 µl et transférer le volume entier de chaque bibliothèque de la plaque ELU1 PCR dans le puits correspondant de la plaque CAP2 MIDI.
- Jeter la plaque ELU1 PCR vide.
- Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
- Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- Incuber dans un incubateur de micro-échantillons à 57 °C pendant 25 minutes.
Si vous poursuivez avec la section [Amplifier la bibliothèque enrichie à la page 59](#), suivez les instructions pour les réactifs dans la section [Préparation au protocole](#).
- Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- Laisser la plaque CAP2 MIDI sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.



ATTENTION

Passer immédiatement à l'étape suivante ([Laver à la page 58](#)). Ne pas laisser reposer le culot de billes pendant une durée prolongée sans liquide.

Laver

1. Retirer la plaque CAP2 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 200 µl de RSB à chaque puits.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 4 minutes.
6. Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 minutes.
7. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
8. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer le RSB résiduel de chaque puits.

Éluer

1. Retirer la plaque CAP2 MIDI du support magnétique.
2. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter 22 µl de mélange d'élution EE2 + HP3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque CAP2 MIDI.
4. Jeter le mélange d'élution EE2 + HP3 restant.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque de PCR à 96 puits ELU2 (Elution 2).
9. Mélanger l'ET2 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
10. Ajouter 5 µl d'ET2 à chaque puits de bibliothèque correspondant dans la nouvelle plaque ELU2 PCR.
11. Transférer avec précaution 20 µl d'éluat de chaque puits de bibliothèque de la plaque CAP2 MIDI dans le puits correspondant de la plaque ELU2 PCR.
12. Jeter la plaque MIDI CAP2 vide.
13. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU2 PCR.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
14. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
15. Remettre SMB, EE2, HP3, RSB et ET2 en stockage.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque ELU2 PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

1. Préparer un seau à glace ou équivalent.
2. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (réf. 20031121) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (réf. 20140115)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
PPC3	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Amplifier la bibliothèque enrichie
EPM	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Amplifier la bibliothèque enrichie

Tableau 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20031123) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20140116)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de la librairie enrichie amplifiée
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de la librairie enrichie amplifiée Préparation au séquençage

Amplifier la bibliothèque enrichie

Cette étape utilise des primers pour amplifier les bibliothèques enrichies.

Préparation

1. Si la plaque ELU2 a été conservée, décongeler à température ambiante, puis centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.

Procédure

1. Mélanger le PPC3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
2. Ajouter 5 µl de PPC3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque ELU2 PCR.

3. Mélanger l'EPM à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement.
4. Ajouter 20 µl d'EPM à chaque puits de la bibliothèque.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU2 PCR.
Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
6. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un thermocycleur et exécuter le programme EL-PCR.
Consulter la section [Programmation des thermocycleurs à la page 39](#).
Si vous poursuivez avec la section [Normalisation des bibliothèques à la page 63](#), suivez les instructions de décongélation de la section [Préparation au protocole](#).
8. Remettre le PPC3 et l'EPM en stockage.

Nettoyage de la librairie enrichie amplifiée

Cette étape utilise du SPB pour purifier les bibliothèques enrichies des composants de réaction indésirables. Les billes sont lavées deux fois avec de l'éthanol frais à 80 %. Les bibliothèques sont éluées avec du RSB.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
 - SPB : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes. S'assurer d'utiliser *SPB*, et non *SMB* pour cette procédure.
 - RSB : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
2. Préparer de l'éthanol frais à 80 % dans un tube conique de 15 ml ou 50 ml.

Tableau 27 Préparer de l'éthanol frais à 80 %

Réactif	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
100 % EtOH, pur	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Eau exempte de RNase/DNase	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Mélanger l'EtOH frais à 80 % à l'aide d'un vortex.
4. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits BIND2 (Nettoyer la liaison).
5. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Retirer la plaque ELU2 PCR du thermocycleur.
2. Centrifuger la plaque ELU2 PCR à 280 × g pendant 1 minute.
3. Mélanger le SPB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.

4. Ajouter immédiatement 110 µl de SPB dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque BIND2 MIDI.
Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SPB, inclure un facteur de dépassement de 1,15 lors de l'aliquotage d'une quantité suffisante de matériel par échantillon. Jeter tout matériel restant après l'ajout du SPB dans chaque puits d'échantillon.
5. Transférer 50 µl de chaque bibliothèque de la plaque ELU2 PCR dans le puits correspondant de la plaque BIND2 MIDI.
6. Jeter la plaque ELU2 PCR vide.
7. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BIND2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
8. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
9. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
10. Placer la plaque BIND2 MIDI sur un support magnétique pendant 5 minutes.
11. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
 - a. Conserver la plaque BIND2 MIDI sur le support magnétique et ajouter 200 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque puits.
 - b. Patienter 30 secondes.
 - c. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EtOH résiduel de chaque puits.
4. Jeter l'EtOH à 80 % non utilisé.

Éluer

1. Retirer la plaque BIND2 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 32 µl de RSB à chaque puits de la bibliothèque.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BIND2 MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
6. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque PCR à 96 puits PL (bibliothèques purifiées).
9. Transférer 30 µl de chaque éluat de la plaque BIND2 MIDI dans le puits correspondant de la plaque PL PCR.

10. Jeter la plaque BIND2 MIDI vide.
11. Appliquer un joint adhésif sur la plaque PL PCR.
12. Remettre le SPB et le RSB en stockage.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque de PL PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 30 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

1. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (réf. 20031121) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (réf. 20140115)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNA1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques
EE2	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques

Tableau 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20031123) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20140116)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNB1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Normalisation des bibliothèques
HP3	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques Préparation au séquençage
LNW1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques
LNS1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques

2. Pour poursuivre le même jour avec la [Préparation au séquençage à la page 66](#), suivre les instructions de décongélation dans la section Préparation des étapes du protocole.

Normalisation des bibliothèques

Ce processus utilise du LNB1 plus des additifs (LNA1) pour normaliser la quantité de chaque bibliothèque afin de garantir une représentation uniforme de la bibliothèque dans les bibliothèques regroupées. Les billes sont lavées deux fois avec du LNW1. Les bibliothèques sont éluées avec un mélange d'élution EE2 + HP3 frais et neutralisées avec du LNS1.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
 - LNB1 : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
 - LNA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex.
 - EE2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - HP3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
 - LNW1 : Mélanger à l'aide d'un vortex. Mettre de côté pour une utilisation dans la procédure.
 - LNS1 : Mélanger à l'aide d'un vortex. Mettre de côté pour une utilisation dans la procédure.
2. Mélanger le LNB1 à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension. Retourner le tube de LNB1 pour s'assurer que toutes les billes sont remises en suspension.
3. Répéter l'agitation au vortex pulsé pendant 1 minute si un culot est observé.
4. Utiliser une pipette réglée à 800 µl pour pipeter 10 fois le LNB1 vers le haut et vers le bas pour assurer la resuspension.
5. Préparer immédiatement le mélange maître LNA1 + LNB1 frais dans un tube conique.



ATTENTION

Remettre complètement en suspension le culot de billes de LNB1 au fond du tube pour éviter une densité de grappes incohérente.

Tableau 30 Mélange maître LNA1 + LNB1*

Composant du mélange maître	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
LNA1	610 µl	1 219 µl	1 829 µl	3 658 µl
LNB1	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section [Manipulation des réactifs à la page 31](#) pour les calculs.

6. Mélanger le mélange principal LNA1+LNB1 à l'aide d'un vortex. Mettre de côté pour l'étape [Liaison à la page 64](#).

7. Préparer le mélange d'élution EE2 + HP3 frais dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 31 Mélange d'élution EE2 + HP3 pour la normalisation des bibliothèques*

Composant de mélange d'élution	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section [Manipulation des réactifs à la page 31](#) pour les calculs.

8. Mélanger le mélange d'élution frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Mettre de côté pour l'étape [Éluer à la page 65](#).
9. Si la plaque PL PCR a été conservée, décongeler à température ambiante, centrifuger à 280 × g pendant 1 minute. Pipeter pour mélanger.
10. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits de BBN (normalisation par billes).
11. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Mélanger le mélange principal LNA1+LNB1 à l'aide d'un vortex.
2. Ajouter immédiatement 45 µl de mélange maître LNA1 + LNB1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque BBN MIDI.
3. Éliminer le mélange maître LNA1 + LNB1 restant.
4. Ajouter 20 µl de chaque bibliothèque de la plaque PL PCR dans le puits correspondant de la plaque BBN MIDI.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BBN MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.
7. Appliquer le joint de la plaque adhésive sur la plaque PL PCR et la remettre en stockage.
8. Placer la plaque BBN MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
9. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
 - a. Retirer la plaque BBN MIDI du support magnétique.
 - b. Ajouter 45 µl de LNW1 à chaque puits de la bibliothèque.

- c. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BBN MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
- d. Agiter à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
- e. Placer la plaque BBN MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- f. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
2. Laver les billes une *deuxième* fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer le surnageant résiduel de chaque puits.

Éluer

1. Retirer la plaque BBN MIDI du support magnétique.
2. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter 32 µl de solution EE2 + HP3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque BBN MIDI.
4. Jeter le mélange d'élution restant.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BBN MIDI.
Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque PCR 96 puits NL (bibliothèques normalisées).
9. Transférer avec précaution 30 µl d'éluat de chaque puits de bibliothèque de la plaque BBN MIDI dans le puits correspondant de la plaque NL PCR.



ATTENTION

Si des billes sont aspirées dans les embouts de pipette, les remettre sur la plaque du support magnétique et attendre que le liquide soit clair (~2 minutes) avant de passer à l'étape suivante de la procédure.

10. Jeter la plaque BBN MIDI vide.
11. Mélanger le LNS1 à l'aide d'un vortex.
12. Ajouter 30 µl de LNS1 à chaque puits de la bibliothèque dans la nouvelle plaque NL PCR.
13. Pipeter pour mélanger cinq fois.
14. Appliquer un joint adhésif sur la plaque NL PCR.
Sceller complètement les bords et les puits.
15. Remettre LNB1, LNA1, EE2, LNW1 et LNS1 en stockage.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque NL PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au séquençage.

Commencer la préparation des consommables de séquençage du kit de réactifs NextSeq 550Dx à haut débit v2.5 (300 cycles) (réf. 20028871) au moins une heure avant utilisation.

1. Retirer le tampon de dilution de la bibliothèque (HT1) du stockage entre -25 °C et -15 °C. Décongeler à température ambiante. Après décongélation, garder au froid.
2. Suivre les instructions de préparation du *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)* pour les autres consommables du kit.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
PhiX Control	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante. Après décongélation, garder au froid.	Préparation au séquençage

Tableau 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20031123) en plus de la TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (réf. 20140116)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
HP3	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Préparation au séquençage
RSB (étiquette rose)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Préparation au séquençage

Préparation au séquençage

Chaque série de séquençage de l'ADN doit inclure un contrôle positif et un NTC. Les NTC sont séquencés de manière répétée selon les besoins afin que chaque série contienne un NTC. Chaque analyse comprend un contrôle positif distinct.

Préparation

1. Consulter les directives pour [Nombre de bibliothèques et sélection des index à la page 33](#).
2. Étiqueter un tube de microcentrifugation dHP3 (HP3 dilué).
3. Étiqueter un tube de microcentrifugation dPhiX (PhiX dilué).
4. Préchauffer un bloc chauffant à 96 °C pour les tubes de microcentrifugeuse.
5. Préparer un seau à glace ou équivalent.

Contrôle de dilution et de dénaturation PhiX

1. Mélanger le HP3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
2. Combiner les volumes suivants dans le tube de microcentrifugation dHP3.
 - 10 µl de HP3
 - 190 µl d'eau exempte de RNase/DNase
3. Mélanger le dHP3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
4. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
5. Mélanger le contrôle PhiX à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
6. Combiner les volumes suivants dans le tube de microcentrifugation dPhiX.
 - 8 µl de RSB
 - 2 µl de contrôle PhiX
7. Ajouter 10 µl de dHP3 au tube dPhiX.
8. Jeter le tube dHP3.
9. Mélanger le tube dPhiX à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
10. Incuber le dPhiX à température ambiante pendant 5 minutes pour dénaturer.
11. Mélanger HT1 à l'aide d'un vortex.
12. Ajouter immédiatement 980 µl de HT1 préréfrigéré au dPhiX.
13. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
14. Garder dPhiX au froid jusqu'à utilisation dans la préparation de la deuxième dilution.
La concentration finale est de 20 pM dPhiX.
15. Remettre PhiX, HP3 et RSB en stockage.

Groupement et dénaturation des bibliothèques

1. Si la plaque NL PCR a été conservée, décongeler à température ambiante, puis centrifuger la plaque à 280 × g pendant 1 minute.
2. À l'aide d'une pipette multicanaux fixée à 30 µl, pipeter délicatement les bibliothèques dans la plaque NL PCR 5 fois.
Utiliser de nouveaux conseils pour chaque bibliothèque.



ATTENTION

S'assurer de bien mélanger les bibliothèques pour des performances optimales.

3. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse PDL (bibliothèques d'ADN groupé).
4. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse PHL (bibliothèques de HRD groupé).
5. Transférer 10 µl de chaque bibliothèque d'ADN normalisée OPD2 enrichie de la plaque NL dans le tube PDL.
Ne pas regrouper deux bibliothèques avec la même primer d'indexation.
6. Transférer 10 µl de chaque bibliothèque d'ADN HRD normalisée enrichie en OPD3 de la plaque NL dans le tube PHL.
Ne pas regrouper deux bibliothèques avec la même primer d'indexation.
7. Appliquer un joint adhésif sur la plaque NL PCR.
Sceller complètement les bords et les puits.
8. Mélanger les tubes PDL et PHL à l'aide d'un vortex.
9. Centrifuger brièvement les tubes PDL et PHL.
10. Incuber les tubes PDL et PHL dans un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
11. Placer les tubes PDL et PHL sur de la glace pendant 5 minutes.
12. Mélanger les tubes PDL et PHL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
13. Remettre les tubes PDL et PHL dans de la glace.

Préparer la première dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse DIL1 (Dilution 1).
2. Transférer 20 µl de PDL dans le tube DIL1 vide.
3. Jeter le tube PDL.
4. Ajouter 5 µl de PHL à DIL1.
5. Ajouter 475 µl de HT1 prérefrigéré dans le tube DIL1 (dilution 1/20).
6. Mélanger le tube DIL 1 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
7. Jeter le tube PHL.
8. **[Dépannage]** Après le séquençage, si des échecs de CQ au niveau de la série ou de la bibliothèque systémique associés à la normalisation basée sur les billes sont observés, passer à la section [Dépannage : Préparation de la deuxième dilution ajustée à la page 69](#).

Préparer la deuxième dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml DIL2 (Dilution 2).
2. Transférer 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.
3. Jeter le tube DIL1.
4. Ajouter 1 660 µl de HT1 prérefrigéré dans le tube DIL2 (dilution au 1/850).

5. Mélanger à l'aide d'un vortex 20 pM dPhiX préparé pour le mélange, puis centrifuger brièvement.
6. Ajouter 2,5 µl de dPhiX préparé à 20 pM dans le tube DIL2.
7. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
8. Charger 1 300 µl de DIL2 dans la cartouche de réactif à haut débit v2 NextSeq 550Dx décongelée (300 cycles).
Pour plus d'informations, consulter la section *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.
9. Jeter le tube DIL2.
10. Centrifuger la plaque PCR NL à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.
11. Passer au séquençage.
Pour plus d'informations, consulter la section *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.

Dépannage : Préparation de la deuxième dilution ajustée

Utiliser ce flux de travail de dépannage lorsque, après le séquençage, des échecs de CQ au niveau de la série ou de la bibliothèque systémique associés à la normalisation basée sur les billes sont observés (voir [Dépannage à la page 74](#) pour plus d'informations). Les densités de cluster en dehors de la plage de 170 à 220 K/mm² ne doivent pas être ajustées sauf si elles sont associées à un échec du CQ. Après avoir terminé l'étape *Préparer la première dilution*, préparer une deuxième dilution à l'aide des volumes DIL1 et HT1 ajustés.

REMARQUE La deuxième dilution ajustée est appliquée sur une base de préparation par bibliothèque. Lorsque la densité d'amplifiats élevée ou faible entraîne une série de séquençage non valide ou un CQ de bibliothèque non valide, respectivement, les séries suivantes de la même préparation de bibliothèque peuvent être ajustées à l'aide de la même valeur de densité d'amplifiats. Les séries d'une nouvelle préparation de bibliothèque suivent le flux de travail standard.

1. Utiliser le [Tableau 34](#) pour trouver la plage de densité de l'amplifiat (K/mm²) incluant la valeur observée lors de la série de séquençage. Noter le volume ajusté correspondant de DIL1 (µl) et HT1 (µl).
Le volume de réactif combiné est toujours de 1 700 µl, correspondant au volume de dilution nominal.

Tableau 34 Ajustements du volume en fonction de la densité du cluster

Plage de densité du cluster (K/mm ²)	Volume DIL1 (µl)	Volume HT1 (µl)
≤ 50	199	1501
51–70	169	1531
71–90	123	1577
91–110	95	1605

Plage de densité du cluster (K/mm ²)	Volume DIL1 (µl)	Volume HT1 (µl)
111–130	76	1624
131–150	63	1637
151–169	53	1647
170–220	40	1660
221–240	31	1669
241–260	28	1672
261–280	25	1675
281–300	22	1678
≥ 300	21	1679

2. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml TDIL2 (Dépannage en cas de dilution 2).
3. Transférer le volume de DIL1 du [Tableau 34](#) dans le tube TDIL2 vide.
4. Jeter le tube DIL1.
5. Ajouter le volume de HT1 prérefrigéré du [Tableau 34](#) dans le tube TDIL2.
6. Mélanger à l'aide d'un vortex 20 pM dPhiX préparé pour le mélange, puis centrifuger brièvement.
7. Ajouter 2,5 µl de dPhiX préparé à 20 pM dans le tube TDIL2.
8. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
9. Charger 1 300 µl de TDIL2 dans la cartouche de réactif à haut débit v2 NextSeq 550Dx décongelée (300 cycles).
Pour plus d'informations, consulter la section *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.
10. Jeter le tube TDIL2.
11. Centrifuger la plaque NL PCR à 280 × g pendant 1 minute, puis la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.
12. Passer au séquençage.
Pour plus d'informations, consulter la section *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.

Interprétation des résultats

Les résultats de séquençage du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sont rapportés pour chaque échantillon individuellement dans un rapport PDF et un rapport JSON. Un rapport de faible profondeur (`LowDepthReport.tsv`) est également généré au niveau de l'échantillon.

Au niveau de l'exécution, les fichiers de sortie suivants sont générés :

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

Seuls les variants qui réussissent le contrôle qualité apparaissent dans les rapports PDF et JSON.

Pour des informations détaillées sur l'analyse, consulter le *Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (document n° 200080937).

Résultats de diagnostics compagnons

Pour l'utilisation prévue du CDx, il existe trois résultats possibles :

- **Positif** : un variant ou un biomarqueur est détecté (CDx).
- **Non détecté** : aucun variant ou biomarqueur associé à l'utilisation prévue du CDx n'est détecté dans l'échantillon. Le type de cancer sélectionné pour l'échantillon est approprié pour le CDx.
- **Aucun résultat** : la détermination d'un statut de variant ou biomarqueur n'est pas possible pour une ou plusieurs des raisons suivantes :
 - Le séquençage a échoué aux spécifications de contrôle qualité.
 - La bibliothèque n'a pas répondu aux spécifications de contrôle qualité requises. Pour les catégories de CQ qui ont réussi, aucun variant diagnostique ou biomarqueur compagnon n'a été détecté.
 - La bibliothèque n'a pas répondu aux spécifications de NTC et contrôle positif requises.

Tous les résultats de CDx sont rapportés dans la section Résultats de diagnostics compagnons du rapport JSON. Seuls les résultats positifs sont répertoriés dans la section Résultats de diagnostics compagnons du rapport PDF.

Contrôle qualité

La durée de séquençage, la bibliothèque et la validité du contrôle sont déterminées automatiquement et rapportées par le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU, DRAGEN). Consulter le [Tableau 35](#) et le [Tableau 36](#) pour les mesures et spécifications de CQ appliquées pour la série de séquençage, la bibliothèque et les contrôles. Si le contrôle positif ou le NTC ne répond pas aux spécifications, le logiciel invalide automatiquement les échantillons du patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Pour des informations détaillées sur l'analyse, consulter le *Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)* (document n° 200080937). Le rapport TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), disponible aux formats PDF et JSON, résume les résultats du contrôle

qualité. Les fichiers de rapports se trouvent dans le dossier d'analyse. Consulter le *Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (document n° 200080937)* pour connaître l'emplacement du dossier d'analyse (contient les rapports PDF et JSON) et le dossier d'exécution.

Les séries de séquençage et les bibliothèques non valides doivent être répétées. Pour plus d'informations sur la répétition des analyses de séquençage ou des tests des bibliothèques, consulter la section [Dépannage à la page 74](#). Effectuer des mesures de contrôle qualité supplémentaires conformément au système de gestion de la qualité du laboratoire conformément aux réglementations locales, étatiques et/ou fédérales ou aux exigences d'accréditation.

Pour plus d'informations sur la quantification de l'acide nucléique et les exigences minimales en matière d'entrée, consulter la section [Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques à la page 23](#).

Tableau 35 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Métriques CQ des résultats du rapport

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Description	Impact de la défaillance de spécification*
Analyse de séquençage	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Pourcentage de lectures passant le filtre (PF).	Cycle de séquençage invalidé. Aucun résultat n'a été rapporté pour aucun échantillon de l'analyse.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Pourcentage moyen de définitions de base avec un score de qualité de Q30 ou supérieur pour la lecture 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Pourcentage moyen de définitions de base avec un score de qualité Q30 ou supérieur pour la lecture 2.	

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Description	Impact de la défaillance de spécification*
Bibliothèques d'ADN	CONTAMINATION_SCORE	$\leq 1\,457$	Le score de contamination basé sur la distribution de la fréquence des allèles variants (FVA) des SNP.	Aucun résultat d'ADN n'a été rapporté.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (pb)	≥ 70	La longueur médiane du fragment pour chaque index d'échantillon	Aucun résultat BRCA ou petit variant d'ADN n'a été rapporté.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (nombre)	≥ 150	Couverture médiane des fragments d'exon sur toutes les bases d'exon.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Pourcentage de bases d'exon avec une couverture de fragment 50X.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Pourcentage de lectures chimériques.	Aucun résultat de grand réarrangement BRCA n'a été rapporté.
	GENE_SCALED_MAD (nombre)	$0 \leq x \leq 0,134$	La médiane des écarts absolus par rapport à la médiane du nombre normalisé de chaque région cible de NVC.	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (nombre)	$\geq 1,0$	Nombre médian de bacs bruts par cible CNV.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	Pourcentage de sondes HRD avec une couverture de fragment 50X.	Aucun résultat SIG n'a été rapporté.
	EXCESSIVE_TF (nombre)	≤ 0	Mesure du mode erreur indiquant si la fraction tumorale est excessive et si les signaux tumoraux et normaux ne peuvent plus être différenciés pour le calcul du SIG.	

* Les résultats réussis portent la mention PASS.

Tableau 36 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Métriques de contrôle des résultats du rapport

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Impact de la défaillance de spécification*
Contrôle positif d'ADN	Sensibilité aux petits variants d'ADN	51 des 54 variants spécifiés détectés	Le logiciel invalide automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Aucun résultat BRCA ou petit variant d'ADN n'a été rapporté.
	Sensibilité à l'amplification génétique	3 des 3 variants spécifiés détectés	Le logiciel invalide automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Aucun résultat de grand réarrangement BRCA n'a été rapporté.
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50	Le logiciel invalide automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Aucun résultat SIG n'a été rapporté.
Contrôle sans modèle ADN	MEDIAN_EXON_COVERAGE	≤ 8	Le logiciel invalide automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Aucun résultat de petit variant d'ADN BRCA et de grand réarrangement BRCA n'a été rapporté.
	MEDIAN_TARGET_COVERAGE	≤ 2	Le logiciel invalide automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Aucun résultat SIG n'a été rapporté.

* Les résultats réussis portent la mention PASS.

Dépannage

Utiliser le [Tableau 37](#) pour résoudre les problèmes dans le flux de travail. Si un séquençage ou une préparation de bibliothèque pour un échantillon échoue deux fois, un dépannage supplémentaire peut être nécessaire. Contacter l'assistance technique Illumina.

Avant de prendre les mesures de dépannage recommandées, prendre en compte les deux catégories générales de causes pour lesquelles les bibliothèques ne répondent pas aux spécifications de contrôle qualité (CQ). Lorsque les bibliothèques d'ADN ne réussissent pas le CQ, la cause sous-jacente est généralement *soit spécifique à l'échantillon ou au puits, soit systémique* au flux de travail.

Des erreurs spécifiques à l'échantillon ou au puits peuvent résulter d'erreurs de manipulation ou d'une qualité inhérente à l'échantillon. Des erreurs systémiques peuvent survenir lors de l'utilisation, de l'équipement, des réactifs ou de la manipulation des réactifs et peuvent affecter plusieurs bibliothèques. Bien que les erreurs systémiques soient plus probables lorsque toutes les bibliothèques échouent au CQ, la variabilité de la qualité de l'échantillon peut entraîner des erreurs systémiques n'affectant qu'un sous-ensemble de bibliothèques ou une seule bibliothèque.

Analyser les indicateurs suivants pour identifier la source probable du résultat non valide.

- Inspecter le nombre total de lectures PF (mesure étendue) pour chaque bibliothèque à partir de `MetricsOutput.tsv`. Des valeurs similaires indiquent un problème systémique, tandis qu'un faible nombre total de lectures PF pour un ou quelques échantillons, y compris les échantillons ne passant pas le contrôle qualité de la bibliothèque, suggère un problème d'échantillon ou de puits.
- Inspecter le nombre total de lectures PF pour le contrôle positif d'ADN dans `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` et comparer la mesure aux valeurs historiques. Une réduction de cette mesure pour un contrôle positif pourrait indiquer un problème systémique.

Si une série de séquençage ne répond pas aux spécifications de contrôle qualité de la série, la cause est une erreur systémique.

Tableau 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Dépannage

Observation	Cause possible	Action recommandée
Le séquençage ne réussit pas les spécifications de contrôle qualité.	• Erreur de regroupement • Erreur de dilution • Problèmes liés à la préparation des consommables de séquençage (par exemple, décongélation insuffisante, condensation/débris sur la flow cell)	Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section Préparation au séquençage à la page 66 .

Observation	Cause possible	Action recommandée
	Normalisation basée sur les billes : densité d'amplifiat élevée	Si une erreur répertoriée est suspectée, corriger le problème et reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR Bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section Préparation au séquençage à la page 66. Si aucune des autres erreurs énumérées n'est suspectée, la concentration des billes du tube de réactif LNB1 peut avoir causé une densité d'amplifiats élevée. Cela peut être dû à un mélange insuffisant des billes. Trouver la valeur de densité du cluster à partir de <code>RunCompletionStatus.xml</code> dans le dossier d'analyse. La plage optimale de densité d'amplifiat est de 170 à 220 K/mm², mais des valeurs plus élevées peuvent toujours produire des séries qui répondent aux spécifications de CQ. Si la densité de l'amplifiat est supérieure à la plage optimale et que la série de séquençage n'a pas réussi les spécifications de CQ, les bibliothèques de la plaque PCR Bibliothèques normalisées (NL) peuvent être reséquencées avec et ajustées à la deuxième dilution. Répéter la Préparation au séquençage à la page 66 et suivre les instructions pour le dépannage.

Observation	Cause possible	Action recommandée
Erreur lors de la génération du rapport ou erreur générale de l'instrument (erreur réseau, erreurs de chargement/déchargement des réactifs, etc.).	Problème de logiciel ou d'instrument.	Consulter le <i>Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> (document n° 200080937) pour obtenir de l'aide sur la génération de rapports. Contacter l'assistance technique Illumina pour obtenir davantage d'aide.
La bibliothèque d'ADN ne répond pas aux spécifications de contrôle qualité.	Les exigences pour la saisie d'échantillons n'ont pas été satisfaites.	S'assurer que l'échantillon est correctement saisi et répéter la préparation de la bibliothèque à partir de l'étape Fragmentation de l'ADNg. Consulter les sections Exigences relatives aux échantillons à la page 23 et Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques à la page 23.

Observation	Cause possible	Action recommandée
	Erreur d'utilisation ou d'équipement dans le flux de travail du test.	Répéter la préparation de la bibliothèque à partir de l'une des étapes suivantes en fonction de l'endroit où l'utilisation suspectée ou l'erreur d'équipement s'est produite. En cas d'inconnu ou d'autres erreurs, contacter l'assistance technique Illumina pour dépanner votre exécution. • Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section Préparation au séquençage à la page 66. • Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section Fragmentation de l'ADNg à la page 40.

Observation	Cause possible	Action recommandée
La bibliothèque d'ADN ne répond pas aux spécifications de contrôle qualité (suite).	Les critères CONTAMINATION_SCORE ne sont pas satisfaits.	Consulter les avertissements et précautions pour obtenir des informations sur la façon d'éviter la contamination croisée. Examiner la disposition des plaques et l'indexation des bibliothèques pour s'assurer que les échantillons du même index n'ont pas été séquencés ensemble. Pour les échantillons affectés, commencer la préparation de la bibliothèque dès le début du flux de travail. Consulter la section Fragmentation de l'ADNg à la page 40. Une contamination peut s'être produite pendant l'extraction de l'échantillon. Il peut être nécessaire de répéter l'extraction pour s'assurer que l'échantillon est exempt de contamination.

Observation	Cause possible	Action recommandée
	L'échantillon peut être trop fragmenté ou présenter des dommages à l'acide nucléique qui ont un impact sur la capacité à générer suffisamment de bibliothèques uniques.	Examiner la section Paramètres de configuration de l'appareil à ultrasons pour la fragmentation de l'ADN à la page 20 et les paramètres du fabricant de l'appareil à ultrasons pour l'utilisation et le fonctionnement (y compris le niveau d'eau et le type de tube). S'assurer que l'échantillon est correctement saisi dans le test. Consulter les sections Exigences relatives aux échantillons à la page 23 et Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques à la page 23. Une nouvelle extraction de l'échantillon et/ou la répétition de l'étape Fragmentation de l'ADNg peuvent être nécessaires si l'échantillon est trop fragmenté ou endommagé.
	• Erreur de regroupement. • Erreur de dilution. • Dénaturation thermique incomplète de PDL/PHL.	Exclure les causes liées à l'ADN énumérées ci-dessus (p. ex., entrée d'échantillon, qualité d'échantillon, équipement). Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section Préparation au séquençage à la page 66.

Observation	Cause possible	Action recommandée
La bibliothèque d'ADN ne répond pas aux spécifications de contrôle qualité (suite).	Normalisation basée sur les billes (faible densité d'amplifiats).	Si aucune des autres causes possibles d'échec du CQ de la bibliothèque n'est suspectée, la concentration des billes du tube de réactif LNB1 peut avoir causé une faible densité d'amplifiats en raison d'un mélange insuffisant. Rechercher et enregistrer la valeur de densité du cluster à partir de <code>RunCompletionStatus.xml</code> dans le dossier d'analyse. Si la densité de l'amplifiat est inférieure à 170 K/mm ² et qu'une normalisation systémique basée sur les billes est suspectée (y compris les preuves des lectures de PF totales pour les contrôles positifs), reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR des bibliothèques normalisées (NL) et suivre les instructions pour une deuxième dilution ajustée. Consulter les sections Préparation au séquençage à la page 66 et Dépannage : Préparation de la deuxième dilution ajustée à la page 69 .
	Erreur dans le flux de travail de préparation de la bibliothèque pendant ou avant l'étape d'indexation PCR.	Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section Fragmentation de l'ADNg à la page 40 .

Observation	Cause possible	Action recommandée
	- Mauvaise utilisation des sondes d'enrichissement. - Erreur dans le flux de travail de préparation de la bibliothèque pendant ou après la première étape d'hybridation.	Une erreur systémique de groupe de sondes (par exemple, l'échange de groupes de sondes) peut entraîner des lectures normales du filtre de passage total, mais la couverture médiane des exons échoue au CQ. Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section Fragmentation de l'ADNg à la page 40.

Observation	Cause possible	Action recommandée
Échec du contrôle positif.	Les exigences relatives à l'entrée d'échantillon pour le contrôle positif n'ont pas été satisfaites. Erreur d'utilisation ou d'équipement dans le flux de travail du test.	S'assurer de la saisie appropriée dans le test. Examiner la disposition des plaques et s'assurer que les réactifs appropriés (sonde, index) se trouvent dans les puits appropriés. S'assurer que l'échantillon de contrôle positif est conservé conformément à l'étiquette. Pour tous les échantillons qui partagent le contrôle positif, répéter la préparation de la bibliothèque à partir de l'une des étapes suivantes en fonction de l'endroit où l'utilisation suspectée ou l'erreur d'équipement s'est produite. En cas d'inconnu ou d'autres erreurs, contacter l'assistance technique Illumina pour dépanner votre exécution. • Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section Préparation au séquençage à la page 66. • Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section Fragmentation de l'ADNg à la page 40.

Observation	Cause possible	Action recommandée
Échec du NCT.	Contamination croisée ou contamination de la zone de travail.	Consulter la section Avertissements et précautions pour obtenir des informations sur la décontamination des zones de travail et éviter une contamination croisée. Examiner la disposition des plaques et l'indexation des bibliothèques pour s'assurer que les échantillons du même index n'ont pas été séquencés ensemble. Répéter la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail pour toutes les bibliothèques qui partagent le contrôle sans modèle.
	Indexation incorrecte de la bibliothèque.	
Les contrôles positifs et/ou négatifs de la série de séquençage ont été analysés en tant qu'échantillons non témoins.	Attribution incorrecte du type d'échantillon pendant la configuration de la série de séquençage.	Mettre l'analyse en file d'attente avec les contrôles correctement identifiés comme indiqué dans le Guide de flux de travail du module d'analyse (consulter le <i>Guide de flux de travail du module d'analyse Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> (document n° 200080937)).

Caractéristiques de performances

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est un test qui permet d'évaluer le HRD à l'aide d'ADN extrait d'échantillons de tissu tumoral FFPE provenant de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Il utilise deux panels NGS. Un panel est utilisé pour détecter les altérations délétères et délétères suspectées dans les gènes BRCA1 et BRCA2, y compris les petits variants d'ADN et les grands réarrangements. Un deuxième panel NGS est utilisé pour mesurer l'instabilité génomique qui est rapportée sous forme de SIG. Le BRCA positif est défini comme la détection d'une altération délétère ou délétère suspectée dans les gènes BRCA1 ou BRCA2. Le SIG positif est défini comme un SIG ≥ 42 . HRD positif est défini comme BRCA positif et/ou positif au SIG.

Des échantillons FFPE avec des variants CDx positifs spécifiques ont été inclus dans les études.

Les intervalles de confiance (CI) 95 % bilatéraux sont calculés à l'aide de la méthode de notation de Wilson, sauf indication contraire.

Le [Tableau 38](#) fournit les définitions des métriques calculées dans diverses études.

Tableau 38 Définitions des métriques

Terme	Définition
Pourcentage de concordance positive (PPA)	Le pourcentage de résultats positifs de la méthode de comparaison pour lesquels TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est positif.
Pourcentage de concordance négative (NPA)	Le pourcentage de résultats négatifs de la méthode de comparaison pour lesquels TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est négatif.
Pourcentage de définition positive (PPC)	Pourcentage d'observations positif pour une cible parmi les observations qui devraient être positives pour la cible.
Pourcentage de détections négatif (PNC)	Pourcentage d'observations négatif pour une cible parmi les observations qui devraient être négatives pour la cible.
n/N	Nombre d'observations positives ou négatives (n) divisé par le nombre total d'observations (N) pour calculer le PPC ou le PNC, respectivement. Les valeurs de n et N peuvent être à différents niveaux (p. ex., variant ou gène) ou combinées dans un groupe (p. ex., SNV).
Écart-type (ET)	Mesure de la quantité de variation des valeurs d'une variable par rapport à sa moyenne.
Coefficient de variation en pourcentage (% CV)	Écart-type divisé par la moyenne en pourcentage.

Précision

La précision du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) pour détecter le HRD chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire a été démontrée en évaluant la concordance du statut HRD, du statut SIG et des résultats du statut BRCA entre le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et un test comparateur validé basé sur le NGS. La précision a été estimée par rapport à la méthode orthogonale ; le PPA, le NPA et l'IC bilatéral à 95 % du score de Wilson associé ont été calculés.

175 échantillons de tissus FFPE issus de cancers de l'ovaire ont été testés avec le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et/ou la méthode orthogonale. Un échantillon avait des résultats TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) non valides, et un autre échantillon avait des résultats de test comparateur non valides. L'ensemble de données évaluables pour le statut SIG et HRD était de 173 échantillons. L'ensemble de données évaluables pour le statut BRCA était de 169 en raison de l'exclusion de quatre échantillons supplémentaires avec des variants BRCA en dehors de la plage de mesure du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Les analyses de concordance basées sur des résultats de test valides sont présentées dans le [Tableau 39](#), le [Tableau 40](#) et le [Tableau 41](#).

Tableau 39 Concordance entre le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et la méthode de comparaison pour la détection du statut HRD

		Résultat de la méthode de comparaison		
		HRD positif	HRD négatif	Total
Résultat du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	HRD positif	97	6	103
	HRD négatif	6	64	70
	Total	103	70	173
Statistiques de concordance	% PPA (n/N ; IC à 95 %)	94,2 % (97/103 ; 87,9 %, 97,3 %)		
	% NPA (n/N ; IC à 95 %)	91,4 % (64/70 ; 82,5 %, 96,0 %)		

Tableau 40 Concordance entre le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et la méthode de comparaison pour la détection du statut SIG

		Résultat de la méthode de comparaison		
		SIG positif	SIG négatif	Total
Résultat du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	SIG positif	95	3	98
	SIG négatif	6	69	75
	Total	101	72	173
Statistiques de concordance	% PPA (n/N ; IC à 95 %)	94,1 % (95/101 ; 87,6 %, 97,2 %)		
	% NPA (n/N ; IC à 95 %)	95,8 % (69/72 ; 88,5 %, 98,6 %)		

Tableau 41 Concordance entre le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et la méthode de comparaison pour la détection du statut BRCA

		Résultat de la méthode de comparaison		
		Positif BRCA	BRCA négatif	Total
Résultat du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	Positif BRCA	40	8	48
	BRCA négatif	2	119	121
	Total	42	127	169
Statistiques de concordance	% PPA (n/N ; IC à 95 %)	95,2 % (40/42 ; 84,2 %, 98,7 %)		
	% NPA (n/N ; IC à 95 %)	93,7 % (119/127 ; 88,1 %, 96,8 %)		

Reproductibilité

La reproductibilité et la répétabilité du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ont été évaluées sur trois sites de test externes avec deux opérateurs par site, deux réplicats en cours d'analyse, trois lots et trois jours non consécutifs. Sur chacun des trois sites, deux opérateurs ont effectué indépendamment des tests sur des NextSeq 550Dx instruments distincts. Les tests ont été effectués avec un panel de reproductibilité de 27 membres contenant de l'ADN extrait d'échantillons de tissu ovarien FFPE présentant des mutations BRCA1 et BRCA2 connues et/ou un SIG.

Sur les 27 membres du panel, 16 membres du panel ont été ciblés pour de petits variants d'ADN dans les gènes BRCA qui comprennent : SNV, variants dans les régions homopolymères ≥ 5 pb, insertions et délétions < 10 pb, et insertions et délétions ≥ 10 pb. Pour le type de variant LR BRCA, deux membres du panel ont été utilisés pour les variants LR BRCA < 3 exons et un membre du panel pour les variants LR BRCA ≥ 3 exons. Pour SIG, trois membres du panel représentaient le statut SIG élevé (+), trois membres du panel représentaient le SIG (-), deux membres du panel représentaient le SIG faible (+), et l'un des membres du panel représentant déjà les variants LR < 3 niveaux d'exons représentait également un membre SIG faible (+). Sur chaque site, chaque opérateur a

testé les membres du panel au cours de trois jours non consécutifs, générant six observations par cible par membre du panel. Sur les trois sites, 36 observations ont été générées par membre du panel (trois sites × 2 opérateurs/instruments × trois jours × 2 réplicats intra-série).

Le PPC et le PNC pour les membres ciblés du panel ont été déterminés. Des analyses ont été effectuées pour estimer le PPC et le PNC (avec des IC à 95 %) en combinant les résultats de six opérateurs sur trois sites. Pour chaque petit variant d'ADN ciblé et variant LR, les observations du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) chez les membres du panel censés être négatives pour le variant ciblé ont été combinées pour calculer le PNC. Les observations du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) chez les membres du panel SIG (-) ont été combinées pour calculer le PNC pour les membres du panel SIG (-).

Petits variants d'ADN BRCA

Les valeurs PPC pour les membres du panel de petits variants d'ADN BRCA de haut niveau (2-3×C95) et de bas niveau (1-1,5×C95) étaient toutes de 100 % (Tableau 42). Les valeurs PNC pour les membres du panel de petits variants d'ADN BRCA étaient également de 100 % (Tableau 43).

Tableau 42 PPC pour les petits variants d'ADN BRCA ciblés par niveau de variant et classe de variant

Niveau de variant	Classe de variant	Variant ciblé	VAF moyen	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %
Élevé	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)
	Variants dans les homopolymères ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.248	100 (34/34)	(89,8, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.239	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Insertion ou suppression (< 10 pb)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0.166	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.153	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Insertion ou suppression (≥ 10 pb)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0.141	100 (33/33)	(89,6, 100)
Faible	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)
	Variants dans les homopolymères ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0.147	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0.142	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Insertion ou suppression (< 10 pb)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.122	100 (35/35)	(90,1, 100)
	Insertion ou suppression (≥ 10 pb)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.109	100 (35/35)	(90,1, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0.111	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tableau 43 PNC pour les petits variants d'ADN BRCA ciblés par classe de variants

Classe de variant	Variant ciblé	PNC (%) (n/N)	IC à 95 %
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)
Variants dans les homopolymères ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	100 (566/566)	(99,3, 100)
	BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	100 (492/492)	(99,2, 100)
Insertion ou suppression (< 10 pb)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)
Insertion ou suppression (≥ 10 pb)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

Le [Tableau 44](#) montre l'analyse des composants de variance par source de variation pour les niveaux élevés et faibles pour chaque classe de petits variants ADN BRCA. Le VAF moyen sur les petits variants d'ADN BRCA ciblés de haut niveau variait de 0,121 à 0,248, et les petits variants d'ADN BRCA ciblés de bas niveau variaient de 0,087 à 0,147. L'ET total pour les petits variants d'ADN BRCA ciblés allait de 0,019 (11,4 % CV) à 0,041 (28,7 % CV) pour les petits variants d'ADN BRCA de haut niveau, et de 0,016 (18,9 % CV) à 0,043 (30,1 % CV) pour les petits variants d'ADN BRCA de bas niveau.

Tableau 44 Analyse des composants de la variance du VAF pour les petits variants d'ADN BRCA ciblés

Niveau de variant	Classe de variant	Variant ciblé	N	VAF moyen	ET du site (% CV)	ET opérateur/instrument (% CV)	ET de la journée (% CV)	ET du lot (% CV)	ET de répétabilité (% CV)	ET total (% CV)
Élevé	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)
	Variants de l'homopolymère ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	34	0.248	0,000 (0,0)	0,011 (4,3)	0,008 (3,3)	0,000 (0,0)	0,025 (10,1)	0,029 (11,5)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.239	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,000 (0,0)	0,041 (17,0)	0,041 (17,1)
	Insertion ou délétion < 10 pb	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.166	0,006 (3,7)	0,005 (3,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,3)	0,019 (11,4)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	36	0.153	0,008 (5,1)	0,000 (0,0)	0,013 (8,5)	0,000 (0,0)	0,020 (12,9)	0,025 (16,3)
	Insertion ou délétion ≥ 10 pb	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)

Niveau de variant	Classe de variant	Variant ciblé	N	VAF moyen	ET du site (% CV)	ET opérateur/instrument (% CV)	ET de la journée (% CV)	ET du lot (% CV)	ET de répétabilité (% CV)	ET total (% CV)
Faible	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)
	Variants de l'homopolymère ≥ 5 pb	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	36	0.147	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,021 (14,0)	0,021 (14,1)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.142	0,011 (8,0)	0,000 (0,0)	0,010 (7,2)	0,015 (10,7)	0,037 (26,0)	0,043 (30,1)
	Insertion ou délétion < 10 pb	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.121	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (3,7)	0,017 (14,0)	0,017 (14,5)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	35	0.122	0,004 (3,4)	0,007 (5,6)	0,000 (0,0)	0,006 (5,0)	0,021 (16,9)	0,023 (18,8)
	Insertion ou délétion ≥ 10 pb	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)

Grands variants de réarrangement dans BRCA

Les valeurs PPC pour les LR BRCA ciblées étaient de 100 % (29/29) pour les LR BRCA2 ≥ 3 exons, de 97,2 % (35/36) pour les LR BRCA2 < 3 exons et de 94,3 % (33/35) pour les BRCA1 LR < 3 exons ([Tableau 45](#)). Les valeurs PNC pour les LR BRCA ciblés étaient de 98,9 % (630/637) pour BRCA1 et de 100 % (607/607) pour BRCA2 ([Tableau 46](#)).

Tableau 45 PPC pour les LR BRCA ciblés par classe de variants

Classe de variant	Variant ciblé	VAF moyen	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %*
LR ≥ 3 exons	PERTE BRCA2	0.448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 exons	PERTE BRCA2	0.602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	PERTE BRCA1	0.680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tableau 46 PNC pour les LR BRCA ciblés

Variant ciblé	PNC (%) (n/N)	IC à 95 %*
PERTE BRCA1	98,9 (630/637)	(97,7, 99,5)
PERTE BRCA2	100 (607/607)	(99,4, 100)

Le [Tableau 47](#) montre l'analyse des composantes de variance par source de variation pour chaque classe de LR BRCA. Le VAF moyen pour le variant d'exons LR ≥ 3 était de 0,448 avec un ET total de 0,026 (CV de 5,7 %). Le VAF moyen pour les variants d'exons LR < 3 variait de 0,602 à 0,680, et l'ET total variait de 0,038 (6,3 % CV) à 0,079 (11,6 % CV).

Tableau 47 Analyse des composantes de variance du VAF dans les LR BRCA ciblés

Classe de variant	Variant ciblé	N	VAF moyen	ET du site (% CV)	Opérateur / Instrument ET (% CV)	ET de la journée (% CV)	ET du lot (% CV)	Répétabilité ET (% CV)	ET total (% CV)
LR ≥ 3 exons	PERTE BRCA2	29	0.448	0,000 (0,0)	0,005 (1,1)	0,013 (2,9)	0,000 (0,0)	0,022 (4,8)	0,026 (5,7)
LR < 3 exons	PERTE BRCA2	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)
	PERTE BRCA1	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)

Score d'instabilité génomique (SIG)

Les valeurs PPC étaient de 100 % pour les membres du panel SIG élevé (+). Les membres du panel SIG faible (+) présentaient des valeurs PPC allant de 94,4 % à 100 % (Tableau 48). Les valeurs PNC étaient de 100 % pour tous les membres du panel SIG (-) (Tableau 49).

Tableau 48 PPC pour SIG par statut SIG ciblé et membre du panel

État SIG ciblé	SIG ciblé	SIG moyen	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %*
SIG élevé (+)	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)
SIG faible (+)	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)

Tableau 49 PNC pour les membres du panel ciblé négatif SIG

État SIG ciblé	SIG ciblé	SIG moyen	PNC (%) (n/N)	IC à 95 %*
SIG (-)	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)

Le Tableau 50 montre l'analyse des composants de variance par source de variation pour chaque membre du panel ciblé SIG élevé (+), SIG faible (+) et SIG (-). Le SIG moyen parmi les membres du panel ciblé par le SIG allait de 60,1 à 70,2 pour le SIG élevé (+), de 46,3 à 53,1 pour le SIG faible (+), et de 18,2 à 23,3 pour le SIG (-). L'ET total parmi les membres du panel SIG ciblé variait de 2,5 (3,5 % CV) à 3,2 (5,2 % CV) pour les SIG élevés (+), de 1,5 (2,9 % CV) à 3,8 (7,2 % CV) pour le SIG faible (+), et de 2,5 (11,7 % CV) à 3,3 (14,1 % CV) pour les membres du panel SIG (-).

Tableau 50 Analyse des composantes de variance du SIG pour les membres ciblés du panel

État SIG ciblé	SIG ciblé	N	SIG moyen	ET du site (% CV)	Opérateur /			Répétabilité ET (% CV)	ET total (% CV)
					Instrument	ET de la journée (% CV)	ET du lot (% CV)		
					ET (% CV)				
SIG élevé (+)	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)
SIG faible (+)	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)
SIG (-)	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)

Limite du blanc

Le pourcentage de faux positifs (sur le total des négatifs attendus) a été évalué par des tests répétés du tissu ovarien adjacent bénin FFPE. Le tissu devait être négatif au SIG et ne pas contenir de mutations délétères ou suspectées délétères des gènes BRCA1 et BRCA2 (petits variants d'ADN et LR). Sept échantillons d'ADN FFPE ovariens bénins ont été analysés en double avec deux opérateurs sur trois jours pour chacun des deux lots de réactifs au format 8-plex. Un sous-ensemble d'échantillons a été regroupé et reséquéncé dans un format triptyque pour évaluer les faux positifs avec plusieurs configurations multiplex prises en charge par ce dispositif. Au total, il y avait 168 observations possibles. Le pourcentage de faux positifs a été calculé au niveau des positions pour les petits variants de l'ADN BRCA (environ 3 millions de positions), au niveau du gène pour les LR BRCA et au niveau de l'échantillon pour le SIG. Le pourcentage de faux positifs pour les types de variants est indiqué dans le [Tableau 51](#).

Tableau 51 Faux positifs par type de variant d'ADN

Type de variant	Faux positifs*
Petits variants d'ADN BRCA	0 % (0/3 076 657)
LR BRCA	0 % (0/384)
SIG	0 % (0/192)

* Les dénominateurs sont des totaux de séries 8-plex et 3-plex.

Limite de détection

La limite de détection (LDD) des petits variants d'ADN BRCA (SNV, insertions ou délétions ≥ 10 pb, insertions ou délétions < 10 pb, des variants dans les régions homopolymères ≥ 5 pb), des LR BRCA < 3 exons et ≥ 3 exons et du SIG ont été déterminés dans des échantillons d'ADN FFPE du cancer. La LoD est la valeur d'analyte la plus basse qui peut être détectée de manière cohérente (taux de réussite de 95 % ou erreur de type II de 5 %). La LDD pour le SIG était définie comme la teneur tumorale la plus faible qui atteint ≥ 95 % de détection SIG et pour

les petits variants d’ADN BRCA et les LR comme fréquence allélique de variant (FVA). Des échantillons d’ADN FFPE pour le cancer de l’ovaire ont été utilisés pour les petits variants d’ADN BRCA, SIG et LR BRCA ≥ 3 exons. Un échantillon d’ADN FFPE pour le cancer du sein a été utilisé pour les exons LR BRCA < 3 en raison de l’indisponibilité du tissu FFPE pour le cancer de l’ovaire. Les échantillons ont été dilués à plusieurs niveaux de test, avec 12 observations pour chaque niveau de test par lot de réactifs par variant, générées par plusieurs opérateurs sur trois jours non consécutifs à l’aide de deux lots de réactifs. La plus grande LoD entre les deux lots de réactifs a été prise comme limite de détection pour le variant ([Tableau 52](#)).

Tableau 52 Limite de détection pour les petits variants d’ADN BRCA, les LR BRCA, les SIG

Type de variant	Classe de variant	C95
Petits variants d’ADN BRCA	SNV	0,05 VAF
	Insertions ou délétions ≥ 10 pb	0,06 VAF
	Insertions ou délétions < 10 pb	0,07 VAF
	Variants dans l’homopolymère région ≥ 5 pb	0,07 VAF
Grands réarrangements BRCA	LR < 3 exons	0,61 VAF
	LR ≥ 3 exons	0,46 VAF
SIG	SIG	33 % de contenu de tumeur

Substances interférentes

L’impact des substances endogènes et exogènes potentielles sur les performances du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été évalué avec la substance endogène (hémoglobine) qui a étéensemencée dans les échantillons pendant le processus d’extraction de l’acide nucléique, ainsi que des substances exogènes (éthanol, protéinase K, tampon de lavage, paraffine, xylène et excès d’amorces d’index) qui ont étéensemencées dans l’acide nucléique purifié avant la préparation de la bibliothèque. Quatre réplicats des bibliothèques d’échantillons ont été générés par un ou plusieurs opérateurs. Pour toutes les substances, 10 échantillons FFPE de cancer de l’ovaire ont été utilisés pour l’analyse des petits variants d’ADN BRCA, des LR BRCA et du SIG. L’effet de la nécrose a également été évalué sur un ensemble différent de trois échantillons FFPE de cancer de l’ovaire avec une gamme de tissus nécrotiques (10 % à 20 %). Un contrôle macrodisséqué sans nécrose a été inclus pour chaque échantillon de nécrose. Quatre réplicats de bibliothèques d’ADN et leurs contrôles ont été traités ensemble. Pour tous les interférents, les réplicats d’échantillons par substance ont été comparés à leurs réplicats de contrôle respectifs. L’hémoglobine (4 mg/ml), l’éthanol (5 %), la protéinase K (2x la concentration représentative de la méthode d’extraction), le tampon de lavage (2,5 %), la paraffine (25 % du tissu digéré homogénéisé), le xylène (0,0001 %), les primers d’index (30 % d’excès) n’interfèrent pas avec la détection des petits variants d’ADN BRCA, des LR BRCA et du SIG. Les taux de VAF et de SIG du petit variant d’ADN BRCA n’ont pas été affectés par la présence de l’un des interférents testés. La présence de tissu

nécrotique jusqu'à 20 % n'a pas interféré avec les petits variants de l'ADN des gènes BRCA et le SIG. La nécrose des LR BRCA n'a pas été évaluée en raison de l'indisponibilité d'un échantillon FFPE de cancer de l'ovaire nécrotique porteur d'un variant LR BRCA.

Bande de garde de titration d'entrée d'acide nucléique

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) nécessite une entrée fixe de 40 ng d'échantillon d'ADN. Les performances du test ont été évaluées à l'aide de neuf échantillons d'ADN extraits de tissu FFPE ovarien afin d'établir des tolérances pour la variation d'entrée d'acide nucléique qui pourrait entraîner l'échec du test ou avoir un impact négatif sur la sortie du test. Chaque échantillon FFPE contenait un ou plusieurs petits variants d'ADN BRCA, des LR BRCA ou du SIG et a été testé à cinq niveaux d'entrée (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominal], 60 ng et 100 ng) en triple. Les résultats ont démontré que la détection des variants de petit ADN BRCA, la définition des gènes LR BRCA et le statut SIG n'étaient pas affectés par la différence de quantité d'entrée.

Les résultats ont également montré que les entrées d'acide nucléique deux fois en dessous de la condition nominale présentaient un nombre accru d'échecs de CQ, ce qui a entraîné moins d'échantillons évalués pour la définition des variants. Au niveau d'entrée de 20 ng, un taux de validité de la bibliothèque de 55,5 % a été obtenu en raison d'échecs en pourcentage de couverture d'exon à 50X (PCT_EXON_50X) et de couverture d'exon médiane (MEDIAN_EXON_COVERAGE). Le VAF et le SIG du petit variant d'ADN BRCA n'ont pas été affectés au niveau d'entrée de 20 ng.

Contamination croisée

L'étude de contamination croisée a été menée pour évaluer si les résultats faux positifs étaient dus à la contamination de puits en puits lors de la préparation de la bibliothèque d'échantillons ou à la contamination de séquençage en séquençage entre deux séquençages consécutifs. Une analyse a été effectuée pour les petits variants d'ADN BRCA, LR BRCA et SIG. Les bibliothèques ont été préparées à partir des échantillons de cancer de l'ovaire FFPE définis dans une disposition en damier avec des échantillons alternés pour évaluer la contamination de puits à puits, et avec des index alternés pour évaluer la contamination de séquençage d'un cycle à l'autre lorsqu'ils sont séquencés consécutivement sur le même instrument NextSeq 550Dx. L'étude de contamination croisée a montré un taux de 0,8 % de contamination (2/252 événements de contamination) observé en examinant les variants détectés dans chaque échantillon. Aucun événement de contamination n'a été trouvé en analysant les bibliothèques de receveurs en fonction de la définition des petits variants d'ADN BRCA et LR BRCA. Les deux événements de contamination observés étaient des faux positifs pour SIG dans les échantillons de receveurs SIG en raison de la variation SIG intrinsèque et le SIG de ces deux échantillons étant proche du seuil de décision.

L'étude a démontré que le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) devrait avoir une faible occurrence de contamination croisée d'un puits à l'autre ou d'un séquençage à l'autre. Ces résultats, ainsi que les indicateurs de contamination du logiciel, atténuent le risque de faux résultats de variants dus à la contamination des échantillons.

Évaluation du kit d'extraction d'acide nucléique

Trois kits d'extraction d'ADN disponibles dans le commerce ont été évalués avec TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Les trois kits d'extraction différaient en termes d'agent de déparaffinage et d'étapes de liaison à l'acide nucléique ([Tableau 53](#)). Le kit 3 était le kit d'extraction prédominant utilisé pour déterminer les performances de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Cinq échantillons FFPE ovariens ont été soumis à une extraction d'acide nucléique (trois kits x deux opérateurs x trois jours x deux réplicats) pour obtenir de l'ADN (36 observations au total). L'analyse qualitative a montré qu'il n'y avait aucune différence perceptible dans la définition des variants pour l'un des types de variants (petits variants d'ADN BRCA, LR BRCA, SIG), car toutes les observations de variants avaient des valeurs PPC > 97 %. L'analyse quantitative n'a montré aucune différence significative associée aux kits pour le variant de petit ADN BRCA VAF et SIG.

Tableau 53 Caractéristiques du kit

Kit	Nom du kit	Agent de déparaffinage	Liaison aux acides nucléiques
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE Tissu	Xylène	Colonne
2	Beckman Coulter FormaPure XL ADN	Huile minérale	Billes magnétiques
3	FFPE ADN/ARN Qiagen AllPrep	Solution de déparaffinage exclusive	Colonne

Stabilité du réactif

Stabilité en temps réel

La stabilité en temps réel a été évaluée à l'aide de six échantillons de tissu FFPE pour le cancer de l'ovaire. Trois lots de réactifs ont été testés sur six points temporels espacés avec des incréments similaires (3 mois, 6 mois, 9 mois, 13 mois, 19 mois et 25 mois). Deux opérateurs ont effectué des événements de préparation de bibliothèque pour chaque lot, y compris trois réplicats de chaque échantillon, pour un total de six réplicats par lot. Pour les variants d'ADN ciblés de petite taille, le PPC agrégé était de 100 %, pour le PPC agrégé des LR BRCA ciblés était ≥ 92 % et pour le PPC agrégé du SIG était ≥ 83 %. En outre, aucune différence significative n'a été associée au temps pour le variant d'ADN petit SIG ou BRCA VAF.

Stabilité en cours d'utilisation du kit

La stabilité en cours d'utilisation du kit de test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été évaluée dans des conditions d'utilisation standard tout au long de la durée de conservation afin de prendre en charge plusieurs utilisations du kit. Les composants congelés du kit de réactifs ont été soumis à plusieurs congélation/décongélation et les réactifs réfrigérés ont été ramenés à température ambiante et testés pour

prendre en charge jusqu'à quatre utilisations du kit. Tous les critères de contrôle qualité ont été remplis pour tous les cycles de congélation-décongélation et les points temporels testés. La définition des variants a été évaluée pour les petits variants d'ADN BRCA, les LR BRCA et les SIG. Les résultats prennent en charge jusqu'à quatre congélations/décongelations du kit. En outre, un kit de réactifs a été utilisé pour préparer un total de 24 échantillons d'ADN par un opérateur démontrant qu'il y a un volume de réactifs suffisant pour 24 bibliothèques d'ADN et 24 bibliothèques HRD.

Stabilité du transport

La stabilité du transport du kit du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été évaluée à l'aide de neuf échantillons FFPE de cancer de l'ovaire pour montrer la fonctionnalité des kits de réactifs TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) après exposition à des conditions de distribution simulées. Huit échantillons FFPE de cancer de l'ovaire ont été utilisés pour montrer la fonctionnalité après l'exposition du kit de réactifs à des profils de température internationale d'été et d'hiver simulés. Les tests fonctionnels ont été effectués après l'exposition à l'aide des échantillons susmentionnés et comprenaient six à 12 réplicats de chaque échantillon par condition. Les attributs physiques des kits ont également été observés et se sont avérés maintenus après distribution pour tous les cas de test. Les tests fonctionnels ont conclu que l'expédition n'avait pas d'impact négatif sur les variants appelant les petits variants d'ADN BRCA (PPC $\geq 96\%$), les LR BRCA (PPC $\geq 94\%$) et les SIG (PPC = 100 %), par rapport à la condition de contrôle.

Stabilité de l'échantillon

Stabilité des acides nucléiques

La stabilité des acides nucléiques (ADN) et leur quantification associée pour une utilisation avec le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été évaluée à l'aide d'échantillons de tissus FFPE provenant de cancers de l'ovaire. Les blocs FFPE ont été sectionnés et l'ADN a été extrait. L'acide nucléique extrait a été soigneusement mélangé, quantifié, vérifié en matière de qualité et aliquoté dans deux ensembles de tubes à usage unique à congeler pour deux points temporels : T0 (témoin) et T1 (pour prendre en charge 28 jours). Tout l'ADN extrait a été conservé entre -25 °C et -15 °C jusqu'à ce qu'il soit testé à T0 ou T1 avec plusieurs réplicats et opérateurs. T1 a été comparé à T0 pour les petits variants d'ADN BRCA, les LR BRCA et les SIG. Les données indiquent que les acides nucléiques et leur quantification associée pour une utilisation avec le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sont stables jusqu'à 28 jours lorsqu'ils sont conservés aux températures recommandées (-25 °C à -15 °C).

Stabilité de la bibliothèque

La stabilité des bibliothèques utilisant chacun des cinq points d'arrêt sûrs pour le test (voir [Tableau 54](#)) a été évaluée à l'aide de plusieurs échantillons de tissus FFPE provenant de cancers de l'ovaire et d'un échantillon de tissu FFPE provenant d'un cancer du sein. Les bibliothèques de contrôle (T0, aucun point d'arrêt) ont été séquencées immédiatement à la fin du flux de travail. Des aliquotes provenant des mêmes bibliothèques ont été conservées aux points d'arrêt entre -25 °C et -15 °C pendant la durée (T1) pour soutenir les jours énumérés

dans le [Tableau 54](#). T1 a été comparé à T0 pour les petits variants d'ADN BRCA, les LR BRCA et les SIG. Les données indiquent que les bibliothèques générées à partir du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) sont stables conformément au mode d'emploi.

Tableau 54 Temps de stockage de la bibliothèque

Type de bibliothèque	Plaque	Nombre de jours
ADNg fragmenté	LP PCR	≤ 7
Pré-enrichissement	ALS PCR	≤ 30
Post-enrichissement	ELU2 PCR	≤ 7
PCR post-enrichissement	PL PCR	≤ 30
Normalisé	NL PCR	≤ 32

Stabilité des tissus FFPE montés sur lame

La stabilité des tissus FFPE montés sur lame à utiliser avec le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été évaluée en sectionnant des blocs FFPE (sections de 5 µm) à partir de dix échantillons de tissus FFPE issus de cancers de l'ovaire, fixés sur des lames, puis conservés à température ambiante (22 °C) pendant 2 points temporels : T0 (témoin) et T1 (pour prendre en charge 28 jours). L'acide nucléique a été quantifié puis traité par le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) dans les 24 heures pour chaque point temporel. À chaque point temporel, plusieurs réplicats par échantillon ont été testés par plusieurs opérateurs. T1 a été comparé à T0 pour les petits variants d'ADN BRCA, les LR BRCA et les SIG. La définition des variants a été évaluée. Les données indiquent que le tissu FFPE monté sur lame pour une utilisation avec TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) est stable à température ambiante pendant 28 jours maximum.

Étude de transition des performances cliniques HRD

Pour valider le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) en tant que CDx pour la sélection de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire pour le traitement par LYNPARZA (olaparib), des échantillons résiduels provenant de patientes incluses dans l'essai clinique PAOLA-1 (NCT02477644) ont été testés pour soutenir une étude de transition clinique.

L'étude a été menée pour évaluer la concordance du statut HRD entre le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et le test d'essai clinique (ATDM) utilisé dans PAOLA-1, et pour évaluer l'efficacité clinique de l'olaparib chez les patients HRD positifs identifiés par le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). PAOLA-1 était une étude multicentrique de phase III, randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo, évaluant l'efficacité clinique de l'olaparib plus bévaccizumab en tant que traitement d'entretien de première intention pour les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé. Le statut HRD des patients a été déterminé après la randomisation avant l'analyse principale à l'aide de CTA. Le critère d'évaluation principal était la survie sans progression (SSP), définie comme le délai entre la randomisation et la progression, déterminé par l'évaluation de l'investigateur à l'aide des critères RECIST 1.1 modifiés, ou le décès. Sur les 806 patients randomisés dans l'étude PAOLA-1, 399 échantillons résiduels étaient disponibles pour les tests avec TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Les données démographiques des sujets avec des résultats TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

disponibles étaient similaires à celles de l'étude PAOLA-1. De même, les caractéristiques des participants étaient généralement similaires entre ceux qui étaient HRD positifs avec TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et ceux qui étaient HRD positifs avec CTA.

Résultats de concordance

Sur les 399 échantillons disponibles pour les tests avec TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), 382 ont donné un résultat évaluable. Les 17 échantillons non évaluable n'ont pas donné de résultat en raison d'échecs du contrôle qualité du test (N = 12) ou de l'examen pathologique (N = 5) (taux d'invalidité du test de 3 % [12/394]). Au total, 365 patients inclus avaient des échantillons avec des résultats de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et un CTA évaluable. La concordance des résultats de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) relatifs aux résultats CTA entre les échantillons avec des résultats valides est présentée dans le [Tableau 55](#).

Tableau 55 Concordance entre TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) et CTA pour la détection du HRD

		Résultat CTA		
		HRD positif	HRD négatif	Total
Résultat du test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	HRD positif	204	12	216
	HRD négatif	5	144	149
	Total	209	156	365
Statistiques de concordance	% PPA (n/N ; IC à 95 %*)	97,6 % (204/209 ; 94,5 %, 99,2 %)		
	% NPA (n/N ; IC à 95 %*)	92,3 % (144/156 ; 86,9 %, 96,0 %)		
	% OPA (n/N ; IC à 95 %*)	95,3 % (348/365 ; 92,6 %, 97,3 %)		

* IC basé sur la méthode binomiale exacte (Clopper and Pearson, 1934).

Résultats d'efficacité clinique

La performance clinique de TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) a été établie en déterminant l'efficacité clinique dans la population HRD positive. Les rapports de risque (RR) de SSP pour les groupes de traitement olaparib vs placebo ont été calculés à l'aide d'un modèle à risques proportionnels de Cox non ajusté. Le [Tableau 56](#) montre les rapports de risque de SSP chez les participants HRD positifs de CTA et TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). La [Figure 4](#) montre les courbes de Kaplan-Meier pour la SSP chez les participants TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) positifs. Dans les populations HRD positives de CTA et TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), le risque relatif de SSP était de 0,33 (IC à 95 % : 0,25-0,45) et de 0,32 (IC à 95 % : 0,22-0,48), respectivement, et représentait une réduction de 67 % et 68 % du risque de progression ou de décès pour les participants du groupe olaparib plus bévacicumab par rapport au groupe placebo plus

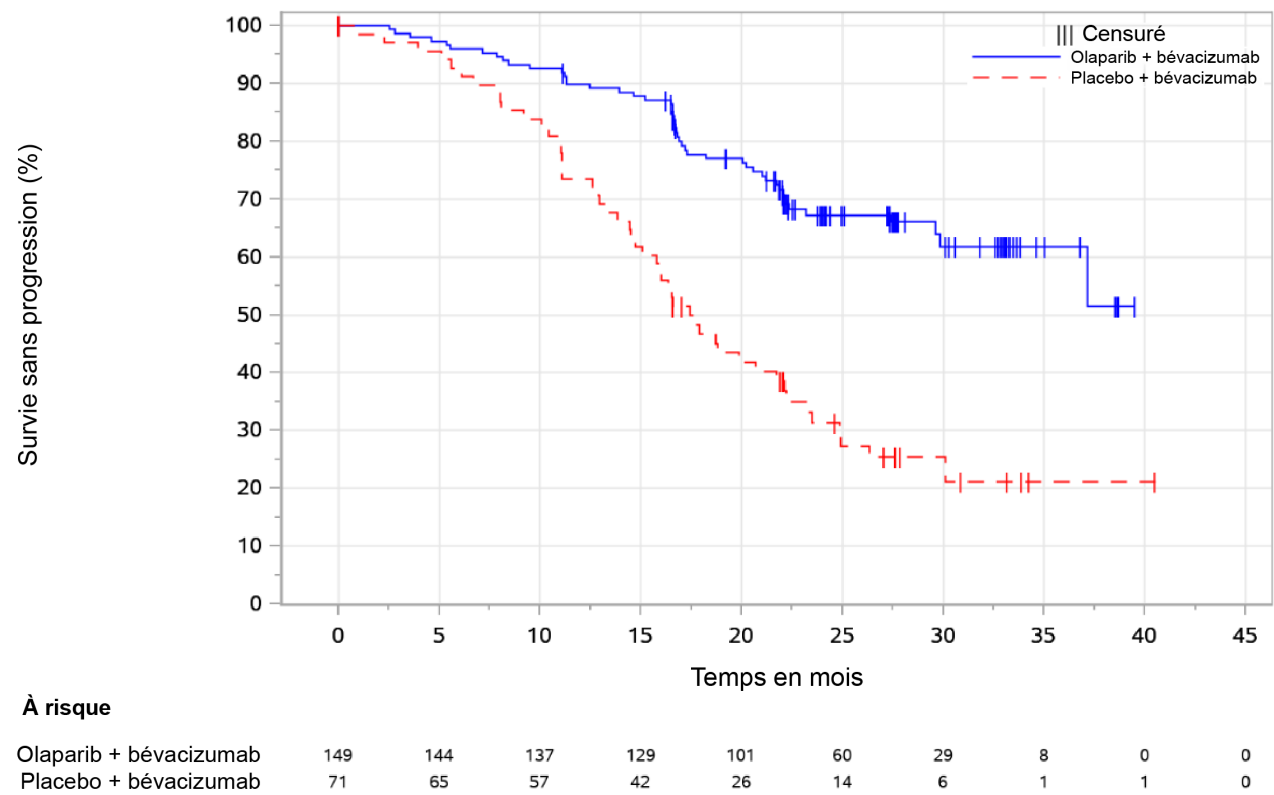
bévacizumab. Une analyse de sensibilité traitant de l'efficacité des résultats CDx manquants imputés a démontré que les rapports de risque de SSP dans les populations HRD positives imputées étaient cohérents avec les estimations de l'analyse principale.

Tableau 56 Efficacité clinique dans l'ATDM et le test TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)

		HRD positif	
		Olaparib +bev	Placebo +bev
CTA	N	225	132
	SSP ¹ (IC à 95 %) ²	37,2 (36,0, NR ⁴)	17,7 (15,8, 19,9)
	RR de SSP (IC à 95 %) ³	0,33 (0,25, 0,45)	
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	N	149	71
	SSP ¹ (IC à 95 %) ²	NR ⁴ (37,2, NR ⁴)	17,4 (14,7, 22,1)
	RR de SSP (IC à 95 %) ³	0,32 (0,22, 0,48)	

¹ SSP médiane en mois.
² À partir de la méthode de limite de produit (Kaplan-Meier) pour les données censurées.
³ Basé sur un modèle de régression de Cox non stratifié avec le traitement comme covariable.
⁴ NR = Non atteint

Figure 4 Courbe de Kaplan-Meier - SSP chez les participants HRD positifs identifiés par TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



Références

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). Publié en 2014. Mis à jour en octobre 2023. Consulté le 7 mars 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

Historique des modifications

Document	Date	Description de la modification
Document n° 200080934 v00	Mai 2026	Publication initiale.

Brevets et Marques

Ce document et son contenu sont la propriété exclusive d'Illumina, Inc. et ses filiales (« Illumina »), et sont destinés à un usage contractuel par ses clients en lien avec l'utilisation du ou des produits décrits dans le présent document et à aucune autre utilisation. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et ne seront communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Par le biais de ce document, Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de son copyright ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque.

Les instructions présentes dans ce document doivent être strictement et explicitement respectées par le personnel qualifié et correctement formé afin d'assurer une utilisation correcte et sécuritaire du ou des produits décrits dans le présent document. Tout le contenu de ce document doit être entièrement lu et compris avant d'utiliser le ou les produits.

LE FAIT DE NE PAS LIRE ENTièrement ET DE NE PAS SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LE PRÉSENT DOCUMENT PEUT CAUSER DES DOMMAGES AU OU AUX PRODUITS, DES BLESSURES AUX PERSONNES, Y COMPRIS AUX UTILISATEURS OU À D'AUTRES PERSONNES, ET DES DOMMAGES À D'AUTRES BIENS, ET ANNULERA TOUTE GARANTIE APPLICABLE AU OU AUX PRODUITS.

ILLUMINA N'ASSUME AUCUNE RESPONSABILITÉ QUANT AUX DOMMAGES DÉCOULANT D'UNE MAUVAISE UTILISATION DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LE PRÉSENT DOCUMENT (Y COMPRIS DES PARTIES DE CELUI-CI OU LE LOGICIEL).

© 2026 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs propriétaires respectifs. Pour plus d'informations sur les marques, consulter la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+(1) 800 809 ILMN (4566)
+(1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



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

Étiquette du produit

Pour obtenir des informations détaillées sur les symboles sur l'emballage et l'étiquette du produit, consulter la légende pour le kit sur l'onglet *Documentation* à l'adresse support.illumina.com.

Un résumé de la sécurité et des performances (SSP) est disponible à l'adresse <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, après le lancement de la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (Eudamed). Il est lié à l'UDI-DI de base (0081627002TSOHRDDGRK).