

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

(EU) Pakningsvedlegg

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK. KUN FOR EKSPORT.

Tiltenkt bruk

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) er en kvalitativ *in vitro*-diagnostisk test som bruker målrettet neste generasjons sekvensering for å muliggjøre vurdering av homolog rekombinasjonsmangel (HRD) ved hjelp av DNA ekstrahert fra formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) tumorvevsprøver fra eggstokkreftpasienter ved hjelp av Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrumentet. Testen kan brukes til å detektere enkelt nukleotidvarianter, insersjoner, deleasjoner og store omorganiseringer i BRCA1- og BRCA2-gener, og rapportere en Genomic Instability Score (GIS).

Testen er ment som en diagnosemedhjelper for å identifisere kreftpasienter for behandling med den målrettede behandlingen vist i [Tabell 1](#), i samsvar med den godkjente terapeutiske produktmerkingen.

Tabell 1 Indikasjon for diagnosemedhjelper

Tumortype	Biomarkør(er) oppdaget	Behandling
Eggstokkreft, inkludert epitelial eggstokkreft, eggleder og primær bukhinnekreft	Homolog rekombinasjonsmangel (HRD) (definert som skadelige eller mistenkte skadelige mutasjoner i BRCA1- og BRCA2-gener og/eller positiv genomisk ustabilitetsscore)	LYNPARZA® (olaparib)

Oppsummering og forklaring av analysen

Klinisk beskrivelse

Eggstokkreft har den høyeste dødelighetsraten blant de gynekologiske malignitetene.¹ Eggstokkreft inkluderer epitelial eggstokk-, eggleder- og primær bukhinnekreft, som alle deler en felles biologisk opprinnelse og anses sammen for terapeutiske formål.^{2,3} Omtrent halvparten av pasientene med høygradig serøs og endometrioid eggstokkreft, som er aktuelle histologiske underkategorier for vurdering, bærer genomiske defekter innenfor den homologe rekombinasjonsreparasjonsveien som resulterer i HRD.⁴ Tilstedeværelsen av HRD er forbundet med sensitivitet overfor platinabasert kjemoterapi⁵ og klinisk respons på poly(adenosindifosfat [ADP]-ribose)-polymerase (PARP)-hemmere (PARPi), en klasse målrettede behandlinger for eggstokkreft,⁶⁻¹² som resulterer i forbedret progresjonsfri og total overlevelse.^{5,13,14} I samsvar med funn fra kliniske seminalstudier^{6,7,12,15} kan kvalifisering for PARPi-behandling ved eggstokkreft, være basert på HRD-positiv status.¹⁶ PAOLA-1 var en multisenter, fase III, randomisert, dobbeltblind, placebokontrollert studie som undersøkte den kliniske effekten

av olaparib pluss bevacizumab som en førstelinje vedlikeholdsbehandling for pasienter med avansert eggstokkreft.¹² TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN)-analysen ble validert ved bruk av prøver fra pasienter som var inkludert i den kliniske studien PAOLA-1.

Blant ulike underliggende mekanismer som svekker reparasjonsveien for homolog rekombinasjon, er de best karakteriserte kimbane- og/eller somatisk funksjonstapmutasjoner i BRCA1- og BRCA2-gener.^{4,13,17} Tester som evaluerer genomisk ustabilitet (f.eks. substitusjoner, delesjoner, kopinummerendringer og strukturelle omorganiseringer), vurderer om det finnes et genomisk arr eller en mutasjonssignatur som indikerer tilstedeværelse av HRD, uavhengig av underliggende årsak. GIS er en måling av genomisk ustabilitet som kombinerer informasjon om store tilstandsoverganger (LST), tap av heterozygositet (LOH) og telomerisk-allelsk ubalanse (TAI). Tilgjengelige kliniske studiedata støtter den kliniske gyldigheten til GIS som en biomarkør som identifiserer BRCA-pasienter med vill type eggstokkreft som får betydelige fordeler av PARPi-behandling.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er en kvalitativ neste generasjons sekvenseringstest (NGS) for ledsagende diagnostikk (CDx) som rapporterer HRD-status hos pasienter med eggstokkreft ved å detektere små DNA-varianter og delesjoner på eksonnivå (referert til som store omorganiseringer [LR]) i BRCA1- og BRCA2-genene, i kombinasjon med å vurdere GIS i forhold til en cut-off på 42.

En liste over regionene i BRCA1- og BRCA2-genene som er utelatt fra variantbetegnelse, finnes i *TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-blokkliste (dokumentnr. 200066147)*, som er tilgjengelig fra [Illumina-støttenettstedet](#).

Prosedyreprinsipper

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

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

- **Bibliotekklargjøring og anriking** – Fra FFPE-vev skjæres 40 ng genomisk DNA (gDNA) i små fragmenter. Universelle adaptere for sekvensering liggeres på gDNA-fragmentene. Adaptersekvensene P5 og P7 er integrert i hvert bibliotek for å gjøre det mulig å fange bibliotekfragmenter på overflaten av strømningscellen under sekvensering. Adapterne inkluderer i5- og i7-indekssekvenser for å identifisere hver enkelt prøve og individuelle molekyler ved hjelp av unike molekylidentifikatorer (UMI-er). Bibliotekene anrikes deretter for de spesifikke genene av interesse ved hjelp av en fangstbasert metode. Biotinylerte probesekvenser som dekker genregioner av interesse og målrettet for analysen hybridiseres til bibliotekene. Probene og de hybridiserte målrettede bibliotekene isoleres fra ikke-målrettede biblioteker ved fangst med streptavidinbelagte magnetiske partikler. De målrettede anrikede bibliotekene vaskes og amplifiseres. Mengden av hvert anrikt bibliotek blir deretter normalisert ved hjelp av en kulebasert metode for å sikre lik representasjon av de sammenslåtte bibliotekene for sekvensering.
- **Sekvensering og primæranalyse** – Normaliserte, anrikede biblioteker slås sammen og klynges på en strømningscelle, og sekvenseres deretter ved hjelp av sekvensering ved syntese (SBS)-kjemi på NextSeq 550Dx. SBS-kjemi bruker en reversibel terminator-metode for å påvise enkle, fluorescensmerkede

deoksynukleotidtrifosfat (dNTP)-baser idet de blir inkorporert i voksende DNA-tråder. Under hver sekvenseringssyklus tilsettes et enkelt dNTP i nukleinsyrekjeden. dNTP-etiketten fungerer som en terminator for polymerisering. Det fluorescerende fargestoffet avbildes etter hver dNTP-inkorporering for å identifisere basen og spaltes deretter for å muliggjøre inkorporering av det neste nukleotidet. Fire reversibel terminator-bundne dNTP-er (A, G, T og C) foreligger som separate enkeltmolekyler. Naturlig konkurranse begrenser derfor inkorporeringsavvik. Under primæranalysen foretas basebestemmelser direkte fra signalintensitetsmålinger under hver sekvenseringssyklus. Dette fører til base for base-sekvensering. En kvalitetsscore tilordnes hvert baseanrop.

- **Sekundæranalyse** – TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul ligger på DRAGEN-server-instrumentet som en del av NextSeq 550Dx-instrumentet-programvaren for å legge til rette for TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-kjøringsoppsettet og for å utføre sekundæranalyse av sekvenseringsresultater. TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul utfører analyser som omfatter validering av kjøringsbehandling og kvalitetskontroll, etterfulgt av demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting og variantbetegnelse. Demultipleksing separerer data fra poolede biblioteker basert på de unike sekvensindeksene som ble lagt til under prosedyren for bibliotekklargjøring. Programvaren genererer FASTQ-mellomfiler som inneholder sekvenseringsavlesningene for hver prøve og kvalitetsresultatene, unntatt avlesninger fra klynger som ikke passerte filtreringen. Sekvenseringsavlesningene innrettes deretter mot et referansegemot for å identifisere en relasjon mellom sekvensene, og blir tilordnet et resultat basert på lignende regioner. Sammenstilte avlesninger skrives til filer i BAM-format. Analyseprogramvaren bruker separate algoritmer for å kalle BRCA1 og BRCA2 små DNA-varianter, BRCA1 og BRCA2 store omorganiseringer og GIS. Flere utdata genereres av analyseprogramvaremodulen, herunder sekvenseringsmetrikk og Variant Call Format (VCF)-filer. VCF-filene inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegemot. Sekvenseringsmetrikk og individuelle utdatafiler genereres for hver prøve.
- **Tertiæranalyse** – Tertiæranalyse, utført av TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul, består av generering av CDx-betegnelse og resultatrapport. De tolkede variantresultatene er oppsummert i rapporten med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater. Se *Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul* (dokumentnr. 200080937) for detaljer om sekundær og tertiær analyse.

Prosedyremessige begrensninger

Kun til *in vitro*-diagnostisk bruk.

- Kun for bruk på resept. Testen må bestilles av kvalifisert medisinsk fagpersonell i samsvar med kliniske laboratorieforskrifter.
- Beslutninger om pasientomsorg og -behandling må baseres på den behandlende legens uavhengige medisinske vurdering, og der det er tatt hensyn til all relevant informasjon om pasientens tilstand, f.eks. pasient- og familieanamnese, fysiske undersøkelser, informasjon fra andre diagnostiske tester og pasientens preferanser, i henhold til standardbehandling i et gitt samfunn.
- FFPE-prøvekvalitet er svært varierende. Kvalitet kan påvirkes på følgende måte.

- Prøver som ikke gjennomgikk standard fikseringsprosedyrer, genererer kanskje ikke ekstraherte nukleinsyrer som oppfyller kvalitetskontrollkravene for analysen ([Kvalitetskontroll på side 64](#)).
- Somatiske drivermutasjoner kan ikke påvises pålitelig hvis tumorinnholdet (etter område) er mindre enn 20 %.
- GIS er kanskje ikke pålitelig hvis tumorinnholdet (etter område) er mindre enn 33 %.
- Ytelsen til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) i prøver tatt fra pasienter som har mottatt organ- eller vevstransplantasjon, er ikke evaluert.
- Kontaminasjonsdeteksjon kan påvirkes på følgende måte.
 - I svært omstrukturerte genomer med delesjoner og tap av heterozygositet, kan TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-programvare feilaktig klassifisere en DNA-prøve som kontaminert (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - Kontaminering under prosedyren kan skyldes nukleinsyre fra tidligere prøvebehandlingstrinn. God laboratoriepraksis og å følge alle forholdsregler og retningslinjer i dette pakningsvedlegget bidrar til å unngå krysskontaminering mellom prøver.
- Et negativt resultat utelukker ikke tilstedeværelse av en mutasjon under deteksjonsgrensene (LoD) for analysen. Endringer ved allelfrekvenser under etablert LoD kan ikke detekteres konsekvent.
- Sensitiviteten for deteksjon av små DNA-varianter kan påvirkes av:
 - Genomisk kontekst med lav kompleksitet.
 - Økende variantlengde.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) har blitt validert for påvisning av BRCA-innsettinger og delesjoner på opptil 19 bp i lengde og store BRCA-omorganiseringer på eksonnivå eller høyere. Varianter over 19 bp i lengde og endringer og hendelser som er subeksoniske, kan ikke detekteres av analysen, men kan påvirke HRD-status. Passende klinisk-patologiske korrelasjoner og laboratoriekorrelasjoner anbefales.
- Slettinger på eksonnivå er de eneste store omorganiseringene rapportert av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Inversjoner på eksonnivå rapporteres ikke av analysen.

Produktkomponenter

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

- TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-sett (Illumina katalognr. 20140799) – Settet inneholder reagenser med tilstrekkelig volum til å generere 24 DNA-biblioteker. Dette volumet inkluderer pasientprøver og kontroller. Settet inneholder probesettet som brukes til å påvise BRCA-mutasjoner. Kontroller selges separat (se [Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med på side 12](#)).



FORSIKTIGHET

RNA-bibliotekklargjøringsreagenser følger med TSO Comprehensive (DRAGEN)-settet, men er ikke nødvendige for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

- TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)-sett (Illumina katalognr. 20134650) – Settet inneholder reagenser med tilstrekkelig volum til å generere 24 DNA-bibliotekberikelser. Dette volumet inkluderer pasientprøver og kontroller. Settet inneholder probesettet som brukes til GIS-bestemmelse.
- Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul (Illumina katalognr. 20132935), som inneholder følgende komponenter:
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kravpakker
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) programvarepakke
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) USB-sett
 En servicerepresentant fra Illumina vil installere riktig versjon av TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul og kravpakken på DRAGEN-server for NextSeq 550Dx-instrumentet. For informasjon om analysemodul, se *Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul (dokumentnr. 200080937)*.

Reagenser

Reagenser som følger med

Illumina leverer følgende reagenser.

TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-settet (Illumina katalognr. 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (frys), PN 20031118

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Bufret vandig løsning som inneholder T4 DNA polymerase og polynukleotidkinase	-25 °C til -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Bufret vandig løsning som inneholder ligase	-25 °C til -15 °C

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider for universell sekvensering	-25 °C til -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider for universell sekvensering	-25 °C til -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C

* Reagens følger med, men er ikke nødvendig for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (kjøleskap), PN 20031119

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig løsning som inneholder magnetkuler	2 °C til 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-løsning	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

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



FORSIKTIGHET

Ikke kombiner indeksprimerne CPxx og UPxx i samme bibliotek.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

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



FORSIKTIGHET

Ikke kombiner indeksprimerne CPxx og UPxx i samme bibliotek.

Indeksprimer	Delenummer	Antall	Volum	i7-indeks	Sekvens	i5-indeks	Sekvens	Oppbevaringstemperatur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C til -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C til -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C til -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C til -15 °C

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

TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap), PN 20031123

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Bufret vandig løsning som inneholder formamid og salter	2 °C til 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og fast fase paramagnetiske kuler kovalent belagt med streptavidin	2 °C til 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroksidløsning	2 °C til 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Bufret vandig løsning	2 °C til 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler	2 °C til 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNB1)	20031482	2	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptanol, og formamid	2 °C til 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandig løsning som inneholder magnetkuler	2 °C til 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (frys), PN 20031121

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider	-25 °C til -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Bufret vandig løsning som inneholder detergent	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Bufret vandig løsning som inneholder P5- og P7-primere	-25 °C til -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-merkaptoetanol og formamid	-25 °C til -15 °C
PhiX (PX3 eller PhiX)	20031492	1	10 µl	Bufret vandig løsning som inneholder PhiX-genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidprobepool	-25 °C til -15 °C

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidprobepool	-25 °C til -15 °C

* Reagens følger med, men er ikke nødvendig for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Følgende reagenser følger med, men kreves ikke for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter, DNA-polymerase, RNase H og nukleotider	-25 °C til -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Bufret vandig løsning som inneholder salter og tilfeldige heksamerere	-25 °C til -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Bufret vandig løsning som inneholder reverse transcriptase	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)-settet (Illumina katalognr. 20134650)

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap), PN 20140116

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

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (frys), PN 20140115

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Bufret vandig løsning som inneholder oligonukleotider	-25 °C til -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	-25 °C til -15 °C

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Bufret vandig løsning som inneholder detergent	-25 °C til -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	1	550 µl	Bufret vandig løsning som inneholder DNA-polymerase og nukleotider	-25 °C til -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Bufret vandig løsning som inneholder P5- og P7-primere	-25 °C til -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-Merkaptoetanol og formamid	-25 °C til -15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, PN 20140117

Reagens	Delenummer	Antall	Volum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Oligonukleotidprobepool	-25 °C til -15 °C

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

Preforsterkningsreagenser

- DNA-ekstraksjons- og rensingsreagenser – Se [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 20](#) for reagenskrav.
- DNA-kvantifiseringsreagenser – Se [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 20](#) for reagenskrav.
- TruSight Oncology-kontroller:
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina katalognr. 20090155)
- Etanol (EtOH), 100 % (alkoholinnhold 200), molekylær biologisk kvalitet
- RNase-/DNase-fritt vann

Postforsterkningsreagenser

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

Reagensoppbevaring og -håndtering

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

Eske	Delenummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (frys)	20031118	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp Enrichment (frys)	20031121	Postforsterkning
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Postforsterkning
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (frys)	20140115	Postforsterkning
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Postforsterkning

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

Eske	Delenummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (kjøleskap)	20031119	Preamplifisering
TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap)	20031123	Postforsterkning
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap)	20140116	Postforsterkning



FORSIKTIGHET

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



FORSIKTIGHET

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

- Endringer i reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Reagensene må ikke brukes hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel endringer i reagensfarge eller uklarhet).
- ERA1-B og TCB1 kan ha produktrelaterte partikler. Følg de spesifikke retningslinjene for håndtering for hver reagens.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens stabilitet er evaluert, og ytelsen er demonstrert i opptil fire anvendelser av settet. Reagenser er stabile når de oppbevares i henhold til de angitte oppbevaringstemperaturer frem til utløpsdatoen som er spesifisert på etiketten på esken.

Utstyr og materiell

Nødvendig utstyr og materialer som ikke følger med

Utstyr og materiell til preforsterkning

Utstyr	Leverandør
Ultrasonikator med tilhørende tilbehør Se Innstillinger for ultradydinstrumentkonfigurasjon for DNA-fragmentering på side 17 .	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubatorer (2) med innsatser for 96-brønners MIDI-plater (2)	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Platesentrifuge med følgende spesifikasjoner: • Kompatibel med 96-brønners mikroplater • Kapasitet 280 × g (+/- 10 %)	Generell laboratorieleverandør
Platerister med følgende spesifikasjoner: • 2 mm kretsløp • Kan ristes ved 1200 o/min og 1800 o/min	Generell laboratorieleverandør
Forseglingsskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: • Utformet for utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet (ikke bunnen) • Kompatibel med 96-brønners MIDI-plate	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Presisjonspipetter som kan levere nøyaktig volumer mellom 2 µl og 1000 µl med følgende spesifikasjoner: • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,02 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 1 µl eller 2 µl Pipettene må kalibreres regelmessig og nøyaktig innenfor 5 % av angitt volum.	Generell laboratorieleverandør
Dråpetellerhjelpemiddel	Generell laboratorieleverandør
Is eller kjøleblokk	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: • Avtrekkbar • Egnet til PCR-plater med kant eller delvis kant • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -20 °C til 100 °C • DNase-/RNase-fri	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugerør med kapasitet på 1,7 ml, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere (engangsbeholder, 50 ml) (eller tilsvarende)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
Kompatible aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønners PCR-plater compatible med termosykler, 0,2 ml (polypropylen brønner)	Generell laboratorieleverandør

Utstyr og materiell til postforsterkning

Utstyr	Leverandør
NextSeq 550Dx Instrument	Illumina, katalognr. 20005715
Platesentrifuge med følgende spesifikasjoner: • Kompatibel med 96-brønners mikroplater • Kapasitet 280 × g (+/- 10 %)	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Termosykler med følgende spesifikasjoner: • Oppvarmet lokk (100 °C) • Omgir et temperaturområde på 4 °C til 99 °C • ±0,25 °C temperaturnøyaktighet • Kompatibel med 96-brønners PCR-plater, 0,2 ml • Se Rampehastighet for termosykler på side 19	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator med innsats for 96-brønners MIDI-plater	Generell laboratorieleverandør
Tørrvarmeblokk som oppfyller følgende spesifikasjoner: • 25 °C til 99 °C temperaturområde • ±5 °C temperaturnøyaktighet • Kontroller at mikrosentrifugerørene er kompatible med varmeblokken	Generell laboratorieleverandør
Platerister med følgende spesifikasjoner: • 2 mm kretsløp • Kan ristes ved 1200 o/min og 1800 o/min	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Forseglingsskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: • Utformet for utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet (ikke bunnen) • Kompatibel med 96-brønners MIDI-plate	Generell laboratorieleverandør
Presisjonspipetter som kan levere nøyaktig volumer mellom 2 µl og 1000 µl med følgende spesifikasjoner: • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,02 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • Enkelt- eller flerkanals pipette med inkrement på 1 µl eller 2 µl Pipettene må kalibreres regelmessig og nøyaktig innenfor 5 % av angitt volum.	Generell laboratorieleverandør
Dråpetellerhjelpemiddel	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: • Avtrekkbar • Egnet til PCR-plater med kant eller delvis kant • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -20 °C til 100 °C • DNase-/RNase-fri	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugerør med kapasitet på 2 ml, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Mikrosentrifugerør med kapasitet på 1,7 ml, nukleasefrie	Generell laboratorieleverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere (engangsbeholder, 50 ml) (eller tilsvarende)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
Kompatible aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)	Fisher Scientific, delnr. AB-0859 eller tilsvarende
96-brønners PCR-plater compatible med termosyklus, 0,2 ml (polypropylen brønner)	Generell laboratorieleverandør
Is eller kjøleblokk	Generell laboratorieleverandør

Innstillinger for ultralydinstrumentkonfigurasjon for DNA-fragmentering

DNA-fragmentering, eller -skjæring, påvirker analyseytelsen ved å fastslå fordelingen av fragmentstørrelsen, som igjen påvirker sekvenseringsdekning. Flere fokuserte ultralydkonfigurasjoner ble evaluert og optimalisert for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen ([Tabell 2](#)).

- Skjæretid ble justert for å maksimere MEDIAN_EXON_COVERAGE-metrikken som er skissert i [Kvalitetskontroll på side 64](#). Skjæretiden (se [Tabell 2](#)) og MEDIAN_INSERT_SIZE-resultater var forskjellig på tvers av konfigurasjoner.
- Konfigurasjonene 1–4 og 6 ble testet med glassrør med 8 strimler. Konfigurasjon 5 brukte ett enkelt glassrør. Rørvolumkapasiteter vises i [Tabell 2](#).
- Optimalisering av konfigurasjoner 3–6 (mindre vannbadvolumer) anvendte pulsering og ble skåret i rør med mindre volum.
- Konfigurasjonene 3–5 ble kuttet i rør med mindre volum. Rørvolumkapasiteter påvirker skjæreparametere.
- Konfigurasjon 4 (linjetransduser, middels stort vannbadvolum, avgasset vann) krevde en lang pulsforsinkelsestid (40 sekunder) for å oppnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE som konfigurasjon 1 og 2 ved nominell input på 40 ng.
- Optimale innstillinger for konfigurasjon 3 resulterte i en litt større fragmentstørrelsesfordeling sammenlignet med de andre konfigurasjonene (MEDIAN_INSERT_SIZE var omtrent 5–10 basepar større).
- Konfigurasjon 3 og 5 brukte ikke-avgasset vann og det minste vannbadvolumet.
- Konfigurasjoner 3 og 5 trengte økt DNA-input (50 ng for konfigurasjon 3, 60 ng for konfigurasjon 5) for å oppnå lignende MEDIAN_EXON_COVERAGE i forhold til de andre 4 konfigurasjonene, som brukte den nominelle 40 ng-input.

- Konfigurasjoner 3 og 5 har mer skade og/eller denaturering og derfor en redusert effektiv masse av brukbare dsDNA-molekyler for bibliotekklargjøring.

Sentrifuger skjæringsrørene under gjenfinningsprosessen for å sørge for at det spesifiserte volumet gjenfinnes, ettersom tap av materiale kan påvirke ytelsen negativt.

Tabell 2 Evaluerte konfigurasjoner av fokusert ultralydinstrument

Parameter	Konfigurasjon					
	1	2	3	4	5	6
Transduser	Linje	Punkt	Punkt	Linje	Punkt	Linje
Vannbadvolum	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Vann avgasset	Ja	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja
Vannkjøler	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Vannbadtemperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Største insidenseffekt (Peak Incident Power – PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% nyttefaktor	30	10	30	25	20	25
Sykluser per puls	200	200	1000	1000	1000	600 ⁵
Pulsering (pulser på 10 sekunder)	Nei	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja
Forsinkelsestid i pulsering	N/A	N/A	10 s	40 s	10 s	10 s
Skjæretid	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Prøvebehandling	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Partistørrelse	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Prøvestørrelse i 8-strimlers glassrør	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkeltrør (50 µl)	130 µl (eller 96 microTUBE-plate)
Dithering	N/A	N/A	N/A	3 mm Y ved 20 mm/s	N/A	1,5 mm Y ved 10 mm/s
DNA-inputekvivalent (for median eksondekning)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Skjæretiden på 200 sekunder består av pulser på 10 sekunder med 20 repetisjoner.

² Skjæretiden på 320 sekunder består av pulser på 10 sekunder med 32 repetisjoner.

Rampehastighet for termosykler

Optimalisering av termisk syklusrampehastighet anbefales. En testet modell ble for eksempel justert fra en standard (og maksimal) rampehastighet på 5 °C/s til 3 °C/s for å oppnå sammenlignbare resultater med andre modeller med lavere standard rampehastigheter.

Prøvetaking, transport og oppbevaring

Følg standardprosedyrer ved innsamling, transport, oppbevaring og behandling av prøver.

Prøvekrav

FFPE-vev

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen krever 40 ng DNA ekstrahert fra ovarie-, eggleder- eller primært peritonealt FFPE-vev. Vev skal fikseres ved hjelp av formalinfiksativ egnet for molekylære analyser (for eksempel 10 % nøytralbufret formalin). Vev må ikke avkalkes. Før TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen utføres, må vevsprøven undersøkes av en patolog for å sørge for at den er egnet for denne testen. Minst 20 % tumorinnhold (etter område) kreves for å detektere somatiske driver-mutasjoner. Minst 33 % tumorinnhold (etter område) kreves for å detektere GIS.

For en høy sannsynlighet for å ekstrahere 40 ng DNA, er det anbefalte vevsvolumet $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Dette volumet tilsvarer et kumulativt levedyktig vevsområde på $\geq 200 \text{ mm}^2$ ved bruk av $5 \mu\text{m}$ tykke snitt, eller $\geq 100 \text{ mm}^2$ ved bruk av $10 \mu\text{m}$ tykke snitt. Det kumulative vevsområdet er summen av det levedyktige vevsområdet i alle snitt som sendes til ekstraksjon. Et kumulativt vevsområde på 200 mm^2 kan for eksempel oppnås ved å ekstrahere fire $5 \mu\text{m}$ -snitt med vevsområde på 50 mm^2 hver eller fem $10 \mu\text{m}$ -snitt med vevsområde på 20 mm^2 hver.

Vevsdød kan redusere mengden nukleinsyreutbytte. For å begrense risikoen for falskt negative resultater kan vevet makrodissekteres for å eliminere dødt vev og oppnå et ønsket anvendelig tumorinnhold.

Objektglassmontert FFPE-vev kan oppbevares i opptil 28 dager ved romtemperatur.

Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring

- Ekstraher DNA fra FFPE-vevsprøver ved hjelp av kommersielt tilgjengelige ekstraksjonssett. Forskjeller i ekstraksjonssett kan påvirke ytelsen. Se [Evaluerer av ekstraksjonssett for nukleinsyre på side 85](#).
- Oppbevar ekstrahert stam nukleinsyre i henhold til instruksjonene fra ekstraksjonssettets produsent.
- Oppbevar ekstrahert DNA i opptil 28 dager ved -25°C til -15°C .
- For å unngå endringer i konsentrasjon over tid, mål DNA innen 28 dager før bibliotekklargjøring starter. Kvantifiser DNA ved hjelp av en fluorometrisk kvantifiseringsmetode som bruker nukleinsyrebindende fargestoffer. Nukleinsyrekonsentrasjonen bør være gjennomsnittet av minst tre målinger.
- Analysen krever 40 ng av hver gDNA-prøve med en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon på $3,33 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Skjæring krever et endelig volum på $52 \mu\text{l}$ ($0,77 \text{ ng}/\mu\text{l}$), der minimum $40 \mu\text{l}$ TEB (inkludert) brukes som fortynner.

Biblioteklagring

Biblioteker kan lagres på PCR-plater i 7 til 32 dager, avhengig av typen bibliotek (se [Tabell 3](#)).

Tabell 3 Biblioteklagringstider

Bibliotek-type	Plate	Antall dager	Oppbevaringstemperatur
Fragmentert gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Preamrikt	ALS PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Postanrikt	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C til -15 °C
Postanrikt PCR	PL PCR	≤ 30	-25 °C til -15 °C
Normalisert	NL PCR	≤ 32	-25 °C til -15 °C

Advarsler og forholdsregler

Sikkerhet



ADVARSEL

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Ventilasjon skal være egnet for håndtering av farlige materialer i reagenser. Bruk verneutstyr, inkludert øyevern, hansker og laboratoriefrakk som er egnet for risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

- Noen komponenter i denne analysen inneholder formamid, et alifatisk amid som er et karsinogen og som kan skade forplantningsevnen. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk. Håndter brukte reagenser som kjemisk avfall, og kast dem i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet ved å søke etter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se *Reagenser som følger med på side 5* for mer informasjon).
- Noen komponenter i denne analysen inneholder 2-merkapttoetanol, et reduksjonsmiddel. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk i et godt ventilert område, og kast tomme beholdere og ubrukt innhold i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet ved å søke etter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se *Reagenser som følger med på side 5* for mer informasjon).
- Noen komponenter i denne analysen inneholder natriumhydroksid, en svært korroderende base. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk. Håndter i samsvar med god laboratoriepraksis og avhend i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet ved å søke etter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se *Reagenser som følger med på side 5* for mer informasjon).

- Noen komponenter i denne analysen (EPM) inneholder tetrametylammoniumklorid, et akutt toksisk middel, hudirriterende og marint forurensende stoff. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk. Håndter i samsvar med god laboratoriepraksis og avhend i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet ved å søke etter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se *Reagenser som følger med på side 5* for mer informasjon).
- Håndter alle prøver som om de er smittefarlige.
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakk ved håndtering av prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøver og analysereagenser.
- Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og aktuelle myndigheter i landet der brukeren og pasienten befinner seg.

Laboratorium

- Sørg for at laboratoriet har en enveis arbeidsflyt for å hindre kontaminasjon. Preamplifiserings- og postamplifiseringsområder må ha dedikert utstyr og materiell (for eksempel dråpetellere, dråpetellerspisser, vortekser og sentrifuge). Hindre medrivning av amplifiseringsprodukt eller -probe ved å unngå å gå tilbake til preamplifiseringsområdet etter å ha gått inn i postamplifiseringsområdet.
- Utfør Indeksering av PCR og anrikings-trinnet i et postamplifiseringsområde for å hindre overføring av amplifiseringsprodukt.
- Bibliotekklargjøringsprosedyrene krever et RNase-/DNase-fritt miljø. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensmiddel. Bruk plast sertifisert til å være fri for DNase, RNase og humant genomisk DNA.
- For postamplifiseringsprosedyrer må arbeidsflater og utstyr rengjøres grundig før og etter hver prosedyre med en nylaget løsning av 0,5 % natriumhypokloritt (NaOCl). La løsningen være i kontakt med overflatene i 10 minutter, og tørk deretter grundig rent med 70 % etyl eller isopropanol.
- Bruk nukleasefrie mikrosentrifugeprøverør, plater, dråpetellerspisser og beholdere.
- Bruk kalibrert utstyr gjennom hele analysen. Kalibrer utstyret i henhold til hastighetene, temperaturene og volumene som er spesifisert i denne protokollen.
- Bruk presisjonsdråpetellere til å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Kalibrer regelmessig i samsvar med produsentens spesifikasjoner.
- Bruk følgende retningslinjer ved bruk av flerkanaIs dråpetellere:
 - Pipetter minst $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Kontroller at barrierespissene sitter godt og egner seg til den flerkanaIs dråpetellerens merke og modell.
 - Fest spissene med en rullende bevegelse for å kontrollere at alle spissene festes like godt.
 - Aspirer i 90° vinkel, med like væskevolumer for alle spissene.

- Bland alle komponentene etter levering ved å pipettere reaksjonsblandingen opp og ned.
- Kontroller etter dispenseringen at det ble dispensert væske helt fra hver spiss.
- Bruk utstyr som er spesifisert for analysen, og still inn programmene i samsvar med instruksjonene.
- Angitte temperaturer for termosykleren og mikroprøveinkubatoren angir reaksjonstemperatur, ikke nødvendigvis utstyrets fastsatte temperatur.

Analyse

- Unngå krysskontaminasjon.
 - Følg god laboratoriepraksis ved håndtering av prøver og reagenser.
 - Bruk nytt engangs-laboratorieutstyr og nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser.
 - Bruk aerosolresistente spisser til å redusere risikoen for krysskontaminasjon.
 - Bruk en enveis arbeidsflyt ved overgang fra preamplifiserings- til postamplifiseringsområdet.
 - Håndter og åpne bare én indeksprimer om gangen. Sett hetten tilbake på hvert indeksrør umiddelbart etter bruk. Ekstra hetter er inkludert i settet.
 - Bytt hansker ofte og hvis de kommer i kontakt med indeksprimere eller prøver.
 - Fjern ubrukte indeksprimerrør fra arbeidsområdet.
 - Ikke returner reagensene til originalrør etter bruk med remserør, kar eller beholder.
 - Bland prøver med en dråpeteller, og sentrifuger platen når dette angis.
 - Bruk en mikroplaterister. Ikke roter platene.
- Ikke bytt om analysekomponenter fra ulike reagenssettloter. Reagenssettloter identifiseres på reagenssettets eskeetikett og hovedlotark.
- God laboratoriepraksis er nødvendig for å hindre at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumenter, prøver og biblioteker. Nuklease- og PCR-produktkontaminasjon kan gi unøyaktige og upålitelige resultater.
- Riktig platetype er nødvendig for optimal analyseytelse og -oppbevaring. Følg plateoverføringsinstruksjonene i [Bruksanvisning på side 32](#).
- Dersom du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i bibliotekskvaliteten.
- Hvis ikke et sikkert stoppunkt er angitt i [Bruksanvisning på side 32](#), går du straks videre til neste trinn.
- Oppbevar analysereagensene eller -komponentene ved angitt temperatur i fastsatte pre-amplifiserings- og post-amplifiseringsområder.
- Ikke lagre reagensene på et frostfritt lager eller i dørrommene i kjøleskapet.
- Reagenser som inneholder kuler (LNB1, SPB og SMB), må ikke fryses.
- Ikke bruk reagenser som har vært oppbevart feil.

- Ikke avvik fra blandings- og håndteringsprosedyrene for hvert reagens. Utilstrekkelig blanding eller for kraftig rotasjon av reagenser kan føre til mislykkede prøveresultater.
- ERA1-B og TCB1 kan ha produktrelaterte partikler. Følg retningslinjene for håndtering for hver spesifikke reagens.
- Klargjør nye hovedblandinger, og kast restvolumet etter bruk.
- Klargjør alltid ny 80 % etanol med RNase-/DNase-fritt vann for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som kan påvirke resultatene. Kast 80 % etanol etter bruk i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser.
- Overfør spesifisert eluatvolum. Dersom det overføres mindre enn spesifisert eluatvolum under elueringstrinnene, kan det påvirke resultatene.
- Bruk følgende retningslinjer for ultrasonikatorer. Følg produsentens instruksjoner.
 - Plasser gDNA langsomt i ultrasonikatorrøret for å unngå å danne bobler. For mye bobler eller en luftspalte i skjæringsrøret kan føre til ufullstendig fragmentering.
 - Dispenser langsomt i ultrasonikatorrør, og unngå å sprute.
 - Væskefortrengning og prøvetap unngås hvis dråpetellerspissen ikke settes inn i bunnen av ultrasonikatorrøret når fragmentert DNA fjernes.
- Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøveinngang.
- Ikke bruk en beholder til å dispensere reagenser for trinn som krever at mindre enn 10 µl materiale tilsettes i hver prøvebrønn.
- Bruk en dråpeteller med fin spiss ved overføring av fragmentert gDNA-prøve fra ultrasonikatorrørene til Library Prep (LP)-platen.
- Bruk kun UMI-adaptore.
- Ikke bruk SUA1-adaptore.
- Tilordne forskjellige indeksprimere til hver bibliotekprøve for å identifisere hvert bibliotek når det samles for sekvensering på en enkelt strømningscelle.
- UPxx-indekser eller CPxx-indekser kan brukes.
- Ikke kombiner indeksprimere CPxx og UPxx i samme bibliotek.
- Uoverensstemmelser mellom prøvene og indeksprimerne forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tapt positiv prøveidentifisering. Angi prøve-ID-er og tilordne indekser i Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul før du starter bibliotekklargjøring. Registrer prøve-ID-er, indeksering og platebrønnorientering for referanse under bibliotekklargjøringen.
- Sekvenser maksimalt 16 DNA-biblioteker per strømningscelle. Sekvenser minst seks biblioteker. Følg retningslinjene i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 28](#).
- Etter bindingstrinnet i [Fange mål ett på side 46](#) og [Fange mål to på side 50](#), gå umiddelbart videre til vasketrinnet for å hindre kulepelleter i å tørke.
- Fjern alt 80 % etanol fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol kan påvirke resultatene.

- Følg det spesifiserte antallet vasker angitt i [Bruksanvisning på side 32](#) for å sikre optimal analyseytelse.
- Resuspender bibliotekkulpelleten for å oppnå konsekvent klyngetetthet på strømningscellen under prosedyren [Normalisere biblioteker på side 56](#).
- DNA-biblioteker fra samme prøve anrikes med to forskjellige probesett, men bruker samme indeks og må sekvenseres på samme strømningscelle.
- Positive kontroller og kontroll uten mal (NTC) må behandles som en prøve og deles for anrikning med begge probesettene.

Prosedyremessige merknader

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbeidsflyten kan gjennomføres i samsvar med følgende plan:
 - Dag 1: DNA-fragmentering av gDNA-prøver, bibliotekklargjøring, og starte (første) hybridisering over natten.
 - Dag 2: Anrikning, normalisering av anrikede biblioteker og plassering av biblioteker på NextSeq 550Dx-instrumentet-instrumentet.
- Dersom det ikke er mulig å utføre TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbeidsflyten i samsvar med denne planen, spesifiseres flere sikre stoppunkter gjennom hele protokollen. Med mindre et sikkert stoppunkt er angitt i protokollen, går du umiddelbart videre til neste trinn.
- Biblioteker avledet fra DNA deles i separate brønner for samtidig anrikning med OPD2-probesettet og OPD3-probesettet. Positive kontroller og NTC-er må følge samme prosedyre.
 - Bruk TruSight Oncology Comp Enrichment-komponentene (PN 20031123, PN 20031121) med OPD2 fra TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122). Biblioteker beriket med OPD2 kalles DNA-biblioteker.
 - Bruk TruSight Oncology Comp HRD Enrichment-komponentene (PN 20140116, PN 20140115) med OPD3 fra TruSight Oncology Comp HRD Content Set (PN 20140117). Biblioteker beriket med OPD3 kalles DNA HRD-biblioteker.
 - Tabeller for klargjøring av hovedblanding omfatter volumoverskudd for å kontrollere at det er tilstrekkelig volum til antallet prøver som behandles.
 - Bruk vann av molekylær kvalitet som er fritt for nukleaser.
 - Skyll spissen etter reagenstilsetning ved å aspirere og dispensere én gang i den relevante brønnen på platen, når annet ikke er angitt i prosedyren.
 - Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
 - Reagenser, prøver og biblioteker må oppbevares kalde ved visse trinn i bruksanvisningen. Dette er definert som å oppbevare på is eller tilsvarende.

Termosyklusprogrammer

- Programmer termosyklusprogrammer på postamplifiseringsutstyr før protokollen startes.

- Kontroller at PCR-platene sitter godt i termosykleren.
- Bruk platene som anbefales av produsenten av termosykleren.

Forsegling av platen og fjerning av forsegling

- Alltid forsegle plater med en ny klebende plateforsegling. Forseglinger må ikke gjenbrukes.
- Forsegl platen ved å påføre klebedekselet sikkert på platen med en forseglingskile eller -rull.
- Alltid forsegl den 96-brønners platen med en ny klebende plateforsegling før trinnene i protokollen følges.
 - Plateristetrinn
 - Sentrifugeringstrinn
 - Termosyklartrinn
 - Hybridiseringer
 - Langtidsoppbevaring
- Sørg for at kantene og brønnene er forseglet for å redusere risikoen for krysskontaminasjon og fordamping.
- Plasser platen på et flatt underlag før du langsomt fjerner forseglingen.
- Sentrifuger ved 280 x g i 1 minutt før forseglingen brytes hvis det observeres væske eller kondens på forseglingen eller sideveggene på platebrønnene.
- Bruk klebende plateforseglinger som er effektive ved –20 °C til 100 °C, og som egner seg til PCR-plater med kant eller delvis kant.

Utstyr

- Kontroller at laboratoriepersonellet er kjent med produsentens instruksjoner for drift og vedlikehold av alt utstyr før analysen startes.

Platetype og plateoverføringer

- Riktig platetype er nødvendig for optimal analyseytelse og -oppbevaring.
- Overfør det spesifiserte volumet fra hver brønn på en plate til tilsvarende brønn på målplaten ved overføring av volumer mellom plater.
- Flerkanals dråpetellere kan brukes ved overføring av prøver mellom remserør eller plater.
- Bruk følgende retningslinjer ved risting av plater.
 - Bruk en platerister til å riste platene. Ikke roter platene.
 - Rist PCR-platene ved 1200 o/min.
 - Rist MIDI-platene ved 1800 o/min.
 - Følg produsentens instruksjoner for å kontrollere at plateristeren holder platen sikkert.

Sentrifugering

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

Håndtering av reagenser

- Sett lokk på alle reagensrørene umiddelbart etter bruk for å begrense fordamping og hindre kontaminasjon.
- Bring reagensene tilbake til den spesifiserte oppbevaringstemperaturen når de ikke lenger er nødvendige for en prosedyre.
- Følg reagensklargjøringen som er beskrevet før hvert prosedyreavsnitt i [Bruksanvisning på side 32](#).
- Klargjør nødvendig volum hovedblanding, elueringsblanding og 80 % etanol for det antallet prøver som behandles.
- Volumene i hovedblandings- og løsningstabellene inneholder overskudd. Følgende viser beregninger av overdoseringsvolum.
 - [Tabell 13](#)
 - Volum med ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,20)$.
 - Volum med ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,20)$.
 - [Tabell 23](#)
 - Volum med EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volum med HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabell 24](#)
 - Volum med EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - Volum med HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,364)$.
 - [Tabell 30](#)
 - Volum med LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (2,0)$.
 - Volum med LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (2,0)$.
 - [Tabell 31](#)
 - Volum med EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,25)$.
 - Volum med HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antall biblioteker}) \times (1,25)$.

Adaptersett

- Bruk kun UMI-adaptore.
- SUA1-adaptore følger med, men kreves ikke for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

Håndtere kuler

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

Antall biblioteker og valg av indekser

Planlegg antall prøvebiblioteker og prøveindekser for sekvenseringskjøringen før kjøringssoppsettet. Følgende retningslinjer for prøvenummer omfatter positive kontroller, men utelukker NTC-er. NTC-er må legges til den planlagte kjøringen som en ekstra prøve.

Indeksprimere identifiserer hver prøve unikt, slik at bibliotekene kan pooles sammen for sekvensering på én strømningscelle. Indekser vises på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) under kjøringssoppsettet på Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul. Tilsett indeksprimeren i hvert prøvebibliotek under bibliotekklargjøringen. *Bruk en ny indeksprimerblanding for hvert prøvebibliotek.*

Indekserte biblioteker fra samme prøve deles i to anrikninger med to forskjellige probesett. De resulterende to anrikkede bibliotekene deler samme indeks og må sekvenseres på samme strømningscelle.

Se [Tabell 4](#) for minimum og maksimum antall biblioteker som skal sekvenseres på én strømningscelle ved sekvensering.

Tabell 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Sekvensering

Bibliotektype	Anriking	Minimum*	Maksimum*
DNA	OPD2	3	8
DNA HRD	OPD3	3	8

* NTC-er bidrar ikke til pleksiteten.

For optimal reagensbruk ved sekvensering på NextSeq 550Dx-instrumentet, sekvenser 8 DNA (OPD2)-biblioteker og 8 DNA HRD (OPD3)-biblioteker per strømningscelle.

Kontroller at indeksprimerne som brukes sammen med prøvene, samsvarer med indeksene som velges i Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul. *Uoverensstemmelser forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tap av positiv prøveidentifisering.*

Det er to typer indekser (UPxx og CPxx) i TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

Ved sekvensering av minimum antall biblioteker (3 DNA-biblioteker og 3 DNA HRD-biblioteker), gjelder følgende krav:

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

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

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) krever TruSight Oncology DNA Control v2 som en positiv kontroll. Inkluder TruSight Oncology DNA Control v2 for hver DNA-sekvenseringskjøring i en gitt bibliotekklargjøringshendelse. Det klargjøres en unik positiv kontroll per planlagt sekvensert kjøring. For mer informasjon, referer

til Pakningsvedlegg for TruSight Oncology DNA Control v2 (EU).

TruSight Oncology DNA Control v2-inngangsmengden er 2 µl.

Inkluder NTC i hver bibliotekklargjøring. NTC sekvenseres gjentatte ganger innen én bibliotekklargjøring. Følg disse retningslinjene for positiv kontroll og NTC:

- Klargjør bibliotek fra positive kontroller og NTC på samme måte som prøvene. Den positive kontrollen og NTC må deles for anrikning med begge probesettene identisk med prøvene.
- Bruk TEB til DNA NTC.
- De positive kontrollene er inkludert i maksimumskravet for biblioteket.
- NTC-ene er ikke inkludert i minimumskravet for biblioteket.
- Bruk UP-indekser til NTC ved sekvensering av minimum antall biblioteker.
- Siden NTC-en sekvenseres gjentatte ganger, kan ikke de valgte indeksene for denne kontrollen gjentas i bibliotekklargjøringen.

Følgende tabeller viser eksempler på plateoppsett for bibliotekklargjøring ([Figur 1](#)). Hver nummerert kolonne representerer én sekvenseringskjøring. NTC sekvenseres for hver kolonne eller hvert kolonnesett.

Tabell 5 Bibliotekklargjøringsplate for én kjøring med seks pasientprøver

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

Tabell 6 Bibliotekklargjøringsplate for tre kjøringer med 20 pasientprøver

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

Bruksanvisning

Figur 1 og Figur 2 viser en oversikt over TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbeidsflyten.

Arbeidsflyt for bibliotekklargjøring

Figur 1 illustrerer arbeidsflyten for bibliotekklargjøring for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Positive kontroller og NCT behandles på samme måte som prøvene. Sikre stoppunkter er merket mellom trinn.

Før protokollen startes, legg inn kjørings- og prøveinformasjon i Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul. Referere til *Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul* (dokumentnr. 200080937).

Figur 1 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Arbeidsflyt (Del 1)



* I praksis-tider og samlede tider er omtrentlige.

Arbeidsflyt for anriking

Figur 2 illustrerer anrikingsarbeidsflyten. Sikre stoppunkter er merket mellom trinn.

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



Programmere termosyklere

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

Tabell 7 Termosyklprogrammer etter amplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklereparametere
Indeksere PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 sykluser med: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • Holdes på 10 °C
Utføre første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • Holdes på 57 °C i 8 til 24 timer
Utføre andre hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • Holdes på 57 °C i 1,5 til 4 timer
Amplifisere anriket bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 18 sykluser med: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • Holdes på 10 °C

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.



FORSIKTIGHET

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

1. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensemiddel.
2. Følg produsentens instruksjoner for å sette opp ultrasonikatorene.
3. Ta DNA-kontrollene ut fra oppbevaring.

4. Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (kjøleskap) (PN 20031119)

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

Fragmentere gDNA

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

Klargjøring

1. Følg anbefalingene i [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 20](#) for å kvantifisere prøver.
2. Forbered TEB – Bland ved å vende eller rotere.

Prosedyre

Klargjøre platen

1. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Bibliotekforberedelse).
Hvis du stopper ved [SIKKERT STOPPUNKT på side 36](#), bruker du en PCR- plate.
2. Dekk til og sett til side for bruk i [Overføre fragmentert DNA på side 36](#).

Fortynne gDNA

1. Tin gDNA-prøvene og DNA-kontrollene ved romtemperatur.
2. Bland ved å pipettere hver gDNA-prøve 10 ganger.
3. Sentrifuger røret et kort øyeblikk for å samle opp dråper.
4. Bland ved å vende eller rotere TEB.
5. Bruk TEB til å klargjøre hver gDNA-prøve i et endelig volum på 52 µl. Se følgende tabell for inndatamengder og minimumskonsentrasjoner basert på prøvetype.
 - Analysen krever en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon for å tillate minst 40 µl TEB for 52 µl-volumet.
 - For DNA-kontroll, bruk 2 µl i et endelig volum på 52 µl.
 - Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøve inn i denne fortynningen for å hindre prøvetap.

Prøvetype	Innmatingsmengde (ng)	Minimum konsentrasjon (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontroll	40	20

Fragmentere

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



FORSIKTIGHET

Plasser gDNA langsomt i røret, og kontroller at det ikke er luftspalter i bunnen av røret. Du finner mer informasjon under [Analyse på side 23](#) og i produsentens instruksjoner.

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

Overføre fragmentert DNA

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

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

Kontroller at det er angitt termosyklusprogrammer for postamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 34](#).

1. Klargjør en isbøtte eller tilsvarende.
2. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (frys)-boks (PN 20031118)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
ERA1-A	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Utføre endereparasjon og A-haling
ERA1-B	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Utføre endereparasjon og A-haling
ALB1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptore
LIG3	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Ligere adaptore

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
UMI (hvit hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptore
STL	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptore
EPM	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Indeksere PCR

Tabell 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (kjøleskap)-boks (PN 20031119)

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

Tabell 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers-boks (PN 20031120)

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

Tabell 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers-boks (PN 20031126)

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

Utføre endereparasjon og A-haling

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

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

Klargjøring

- Forvarm to mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokkinnsetser på følgende måte.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
- Klargjør følgende reagenser:
 - ERA1-A – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevart kaldt.

- ERA1-B – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
Inspiser for utfellinger. Dersom det forekommer utfellinger, varm røret til 37 °C, og bland ved å pipettere, til utfellingene løses opp.
3. Klargjør ERA1-hovedblandingen i et mikrosentrifugerør.
- Tabell 13 ERA1-hovedblanding*
- | Hovedblandingskomponent | 4 biblioteker | 8 biblioteker | 16 biblioteker | 24 biblioteker |
|-------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| ERA1-B | 35 µl | 69 µl | 138 µl | 207 µl |
| ERA1-A | 13,5 µl | 27 µl | 54 µl | 81 µl |
- * Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 27](#) for beregninger.
4. Pipettere sakte 10 ganger for å sikre homogeneitet, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Oppbevar ERA1 mastermiks kaldt.
5. Velg ett av følgende alternativer for å klargjøre platen:
- Hvis prøvene er i en MIDI-plate, klargjør på følgende måte.
 - Merk MIDI-platen på nytt LP2 (Bibliotekforberedelse 2).
 - Dersom noen prøver finnes i separate MIDI-plater, må alle prøvene flyttes til separate brønner på samme MIDI-plate i samsvar med plateoppsettet.
 - Hvis platen er frosset, klargjør på følgende måte.
 - Tin LP PCR-platen til romtemperatur.
 - Sentrifuger platen ved 280 × g i 1 minutt.
 - Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP2 (Bibliotekforberedelse 2).
 - Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen til tilsvarende brønn på LP2 MIDI-platen.
 - Kast LP PCR-platen.

Prosedyre

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

Ligere adaptere

Denne prosessen ligerer adaptere til endene av gDNA-fragmentene.

Klargjøring



FORSIKTIGHET

Bruk kun UMI-adaptere. SUA1-adaptere følger med, men er ikke nødvendige for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

1. Klargjør følgende reagenser:

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

Prosedyre

1. Fjern LP2 MIDI-platen fra is eller tilsvarende.
2. Tilsett 60 µl ALB1 i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen. ALB1 er en viskøs oppløsning. Pipettere sakte for å minimere bobledannelse.
3. Tilsett 5 µl LIG3 i hver prøvebrønn.
4. Tilsett 10 µl UMI (hvit hette) i hver prøvebrønn.
5. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Inkuberes ved romtemperatur i 30 minutter.
8. Roter STL for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
9. Tilsett 5 µl STL i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen.
10. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
11. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.

Rense opp ligering

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

Klargjøring

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

Tabell 14 Klargjør ny 80 % etanol

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

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

Prosedyre

Binde

1. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
2. Tilsett umiddelbart 112 µl SPB i hver prøvebrønn i LP2 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale etter at SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.
3. Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
4. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
5. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
6. Plasser LP2 MIDI-platen på magnetstativet i 10 minutter.
7. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Hold LP2 MIDI-platen på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver prøvebrønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn.
2. Vask kulene en **andre** gang.
3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EtOH fra hver brønn.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

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

Indeksere PCR

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

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - EPM – Oppbevar kaldt.
 - UPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger et kort øyeblikk.
 - CPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger kort.

2. Kontroller at indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul under kjøringssoppsettet. Sørg for å følge instruksjonene angående indeksvalg i [Antall biblioteker og valg av indekser på side 28](#).

**FORSIKTIGHET**

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

Prosedyre

1. Tilsett 5 µl av den egnede indeksprimeren (UPxx eller CPxx) i tilsvarende prøvebrønn på LS PCR-platen i samsvar med indeksene som velges.

**FORSIKTIGHET**

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

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

**FORSIKTIGHET**

Utfør alle etterfølgende trinn i et postamplifiseringsområde for å hindre overføring av amplifiseringsproduktet.

7. Sentrifuger LS PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
8. Plasser på den forhåndsprogrammerte termosykleren for postamplifisering, og kjør I-PCR-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 34](#).
Følg instruksjon for tining for reagenser i Klargjøre protokoll-trinnene hvis du fortsetter med [Sette opp første hybridisering på side 43](#).
9. Sentrifuger LS PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt når I-PCR-programmet er avsluttet.
10. Merk platen på nytt ALS (Forsterkede bibliotekprøver).

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjør for protokoll

Dette preparatet er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til hybridisering over natten.

1. Kontroller at det er angitt termosyklusprogrammer for postamplifisering. Se [Programmere termosyklere på side 34](#).
2. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20031123) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20140116)

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

Tabell 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys)-boks (PN 20031121) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (frys)-boks (PN 20140115)

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

Tabell 17 TruSight Oncology Comp Content Set-boks (PN 20031122)

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

Tabell 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set-boks (PN 20140117)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
OPD3 (blå hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Sette opp første hybridisering

I løpet av denne prosessen hybridiserer to sammenslåinger av oligoer (OPD2 og OPD3) til gDNA-biblioteker klargjort i [Indeksere PCR på side 41](#). Anriking av målrettede områder krever to hybridiseringstrinn. I den første hybridiseringen hybridiserer oligoer til gDNA-biblioteker over natten (8 timer til 24 timer).

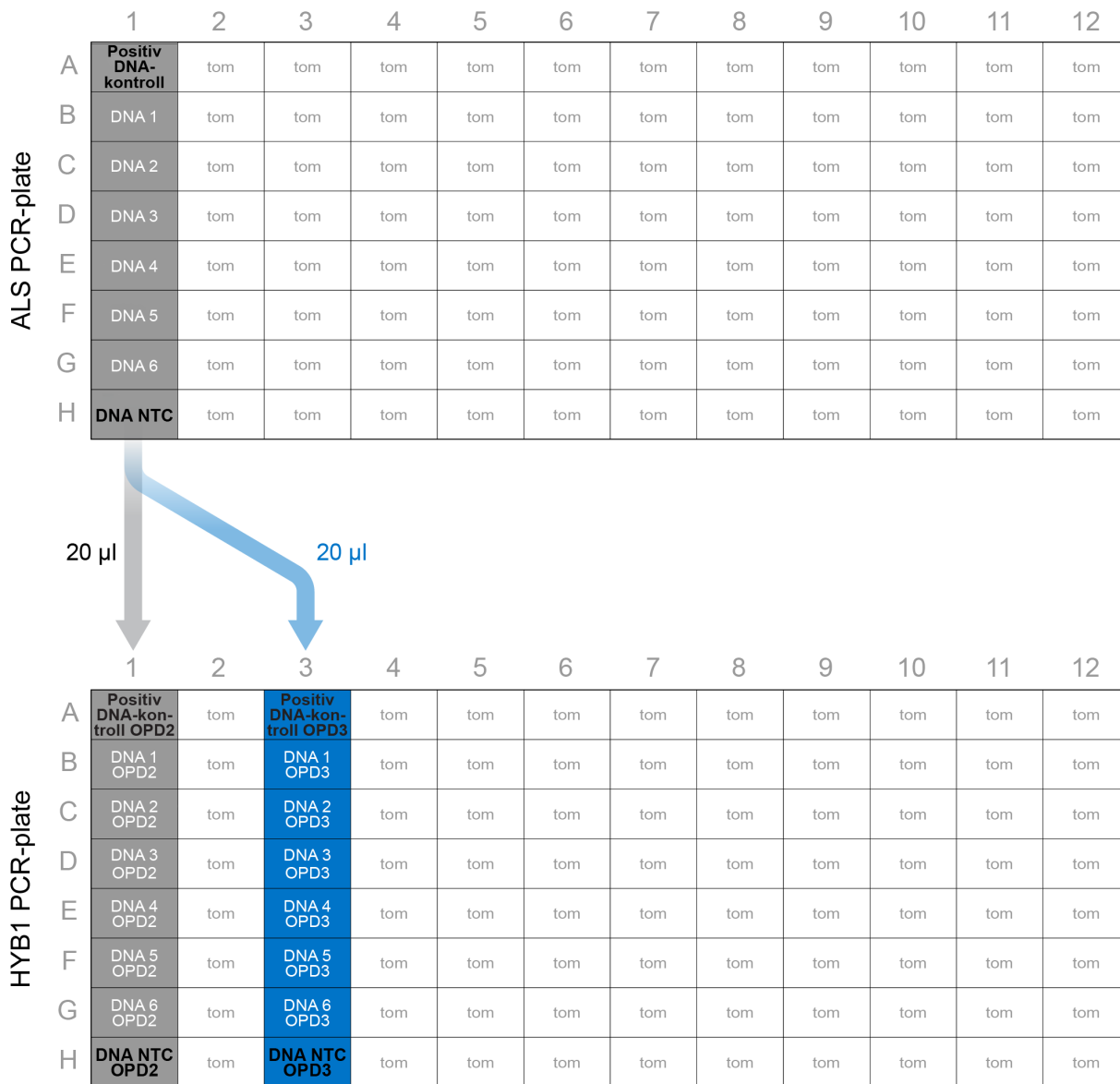
Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - TCB1 – Varm røret ved 37 °C i 5 minutter. Roter for å blande i 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - TCA1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPD2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPD3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Tin ALS PCR-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt. Pipettere for å blande.
3. Merk en ny 96-brønners PCR-plate HYB1 (Hybridisering 1).

Prosedyre

1. Overfør 20 µl av hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-platen til tilsvarende brønn på HYB1 PCR-platen for berikelse med OPD2-prober. Inkluder positive kontroller og NTC-er for anrikning med OPD2-prober.
2. Overfør 20 µl av hvert gDNA-bibliotek fra ALS PCR-platen til en annen brønn på HYB1 PCR-platen for berikelse med OPD3-prober, som vist i [Figur 3](#). Inkluder positive kontroller og NTC-er for anrikning med OPD3-prober.

Figur 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Plateoppsett for første hybridiseringseksempel



3. Påfør klebende plateforsegling på ALS PCR-platen, og sett den til side. Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.

4. Inspiser TCB1 for utfellinger. Varm røret igjen, og roter det til eventuelle krystaller løses opp.
5. Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
6. Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
7. Tilsett prober.

Ikke kombiner forskjellige typer prober. Tilsett bare ett probesett per brønn.

 - **[DNA-bibliotekbrønner]**–tilsett 5 µl OPD2 (hvit hette) til hvert bibliotek uthentet fra DNA.
 - **[DNA-bibliotekbrønner]**–5 µl OPD3 (blå hette) i hvert bibliotek fra DNA for HRD-anrikning.
8. Påfør klebende plateforsegling på HYB1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
9. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
10. Plasser på termosykleren, og kjør HYB1-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 34](#).
11. Hybridiser ved 57 °C i minst 8 timer til maksimalt 24 timer.
12. Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

Fjern reagensrøret fra esken på begynnelsen av dag 2, og følg instruksjon for tining.

Tabell 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20031123) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20140116)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SMB (mørkeblå etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Fange mål ett Fange mål to
ET2	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to Normalisere biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål to Rense amplifisert anrikt bibliotek

Tabell 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys)-boks (PN 20031121) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (frys)-boks (PN 20140115)

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

Tabell 21 TruSight Oncology Comp Content Set-boks (PN 20031122)

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

Tabell 22 TruSight Oncology Comp HRD Content-boks (PN 20140117)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
OPD3 (blå hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering

Fange mål ett

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

Klargjøring

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

Tabell 23 EE2 + HP3-elueringsblanding for innhentingsmål én*

Elueringsblandingskomponent	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 27](#) for beregninger.

4. Roter EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 48](#).
5. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP1 (Capture 1).
6. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Fjern HYB1 PCR-platen fra termosykleren.
2. Sentrifuger HYB1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
3. Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Hvis presipitat eller kulepelleten er til stede, må du sørge for å nå romtemperatur, pipettere opp og ned for å frigjøre pelleten, og deretter rotere for å resuspendere.
4. Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,05 overskuddsfaktor ved alikvotering for å tillate tilstrekkelig materiale per prøve.
5. Etter at SMB er tilsatt i hver prøvebrønn, avhend alt gjenværende materiell.
6. Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra HYB1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP1 MIDI-platen.
7. Kast den tomme HYB1 PCR-platen.
8. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
9. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
10. Inkuber i den forvarmede mikroprøveinkubatoren ved 57 °C i 25 minutter.
11. Plasser CAP1 MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
12. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.



FORSIKTIGHET

Gå umiddelbart videre til neste trinn ([Vaske på side 48](#)). Ikke la kulepelleten være lengre tid uten væske.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Fjern CAP1 MIDI-platen fra magnetstativet.
 - b. Tilsett 200 µl EEW i hver brønn.
 - c. Bruk en dråpeteller satt til 150 µl, og pipettere minst 10 ganger for å blande. Kontroller at alle kulene resuspenderes.

Kontroller at det ikke er noen kulepelletter ved å aspirere den samlede kuleløsningen i brønnen forsiktig til spissen. Inspiser bunnen av hver brønn visuelt. Hvis en kulepellet er tilstede, vinkle dråpetellerspissen mot kulepelleten under vasketrinnene for å løsne pelleten. Sørg for at kulepelleten er helt nedsenket i løsning. Løsningen bør se mørkebrun ut og ha en homogen konsistens.
 - d. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
 - e. Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
 - f. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
 - g. Plasser CAP1 MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
 - h. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en **andre** gang.
3. Vask kulene en **tredje** gang.
4. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EEW fra hver brønn.

Eluere

1. Fjern CAP1 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Roter ny EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
3. Tilsett 17 µl EE2 + HP3-elueringsblanding forsiktig i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
4. Kast gjenværende EE2 + HP3-elueringsblanding.
5. Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.

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

13. Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
14. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
15. Sett EEW tilbake til oppbevaring.

Sette opp andre hybridisering

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

Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:
 - TCB1 – Varm røret ved 37 °C i 5 minutter. Roter for å blande i 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - TCA1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPD2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - OPD3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Prosedyre

1. Inspiser TCB1 for utfellinger. Dersom utfellinger, varm opp røret igjen og roter til krystallene løser seg opp.
2. Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på ELU1 PCR-platen.
3. Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn.
4. Tilsett den samme proben som ble brukt under den første hybridiseringen i hver brønn. Tilsett bare ett probesett per brønn.
Ikke kombiner forskjellige typer prober.
 - **[DNA-bibliotekbrønner]**–Tilsett 5 µl OPD2 (hvit hette) til hvert bibliotek uthentet fra DNA.
 - **[DNA-bibliotekbrønner]**–Tilsett 5 µl OPD3 (blå hette) i hvert bibliotek fra DNA for HRD-anriking.
5. Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
6. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på en termosyklus, og kjør HYB2-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 34](#).
8. Hybridiser ved 57 °C i minst 1,5 timer til maksimalt 4 timer.
9. Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.

Fange mål to

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

Klargjøring

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

Tabell 24 EE2 + HP3-elueringsblanding for innhentingsmål to*

Elueringsblandingskomponent	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 27](#) for beregninger.

4. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 51](#).
5. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP2 (Capture 2).
6. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Fjern ELU1 PCR-platen fra termosykleren.
2. Sentrifuger ELU1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
3. Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
4. Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,05 overskuddsfaktor ved alikvotering for å tillate tilstrekkelig materiale per prøve.
5. Etter at SMB er tilsatt i hver prøvebrønn, avhend alt gjenværende materiell.
6. Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra ELU1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP2 MIDI-platen.

7. Kast den tomme ELU1 PCR-platen.
8. Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
9. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
10. Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
Hvis du fortsetter med [Amplifisere anriket bibliotek på side 52](#), følger du tineinstruksjonene for reagenser i avsnittet [Klargjør for protokoll](#).
11. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
12. Hold CAP2 MDI-platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.

**FORSIKTIGHET**

Gå umiddelbart videre til neste trinn ([Vaske på side 51](#)). Ikke la kulepelleten være lengre tid uten væske.

Vaske

1. Fjern CAP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Bland ved å vende eller rotere RSB.
3. Tilsett 200 µl RSB i hver brønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
5. Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
6. Sett platen på magnetstativet i 2 minutter.
7. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
8. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av RSB fra hver brønn.

Eluere

1. Fjern CAP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Roter ny EE2 + HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
3. Tilsett 22 µl EE2 + HP3-elueringsblanding i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
4. Kast gjenværende EE2 + HP3-elueringsblanding.
5. Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-platen ELU2 (Eluering 2).

9. Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
10. Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU2 PCR-platen.
11. Overfør 20 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU2 PCR-platen.
12. Kast den tomme CAP2 MIDI-platen.
13. Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
14. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
15. Sett SMB, EE2, HP3, RSB og ET2 tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger ELU2 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 7 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

1. Klargjør en isbøtte eller tilsvarende.
2. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys)-boks (PN 20031121) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (frys)-boks (PN 20140115)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PPC3	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Amplifisere anrikt bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Oppbevart kaldt.	Amplifisere anrikt bibliotek

Tabell 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20031123) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20140116)

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

Amplifisere anrikt bibliotek

Dette trinnet bruker primere til å amplifisere anrikede biblioteker.

Klargjøring

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

Prosedyre

1. Bland ved å rotere PPC3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Tilsett 5 µl PPC3 i hver bibliotekbrønn på ELU2 PCR-platen.
3. Bland ved å rotere EPM i 5 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
4. Tilsett 20 µl EPM i hver bibliotekbrønn.
5. Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
6. Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
7. Plasser på en termosyklus, og kjør EL-PCR-programmet.
Se [Programmere termosyklere på side 34](#).
Hvis du fortsetter med [Normalisere biblioteker på side 56](#), følger du tineinstruksjonene i avsnittet [Klargjør for protokoll](#).
8. Sett PPC3 og EPM tilbake til oppbevaring.

Rense amplifisert anrikt bibliotek

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

Klargjøring

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

Tabell 27 Klargjør ny 80 % etanol

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

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

Prosedyre

Binde

1. Fjern ELU2 PCR-platen fra termosykleren.
2. Sentrifuger ELU2 PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt.
3. Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
4. Tilsett umiddelbart 110 µl SPB i hver bibliotekbrønn på BIND2 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale etter at SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.
5. Overfør 50 µl av hvert bibliotek fra ELU2 PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND2 MIDI-platen.
6. Kast den tomme ELU2 PCR-platen.
7. Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
8. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
9. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
10. Plasser BIND2 MIDI-platen på magnetstativet i 5 minutter.
11. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelletten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Hold BIND2 MIDI-platen på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Uten å forstyrre kulepelletten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en **andre** gang.
3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av EtOH fra hver brønn.
4. Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

1. Fjern BIND2 MIDI-platen fra magnetstativet.
2. Snu eller roter for å blande RSB.
3. Tilsett 32 µl RSB i hver bibliotekbrønn.
4. Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.

5. Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
7. Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
8. Merk en ny 96-brønners PCR-platen PL (Rensede biblioteker).
9. Overfør 30 µl av hvert eluat fra BIND2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PL PCR-platen.
10. Kast den tomme BIND2 MIDI-platen.
11. Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen.
12. Sett SPB og RSB tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

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

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører opp til neste sikre stoppepunkt.

1. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys)-boks (PN 20031121) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (frys)-boks (PN 20140115)

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

Tabell 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20031123) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20140116)

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

2. Hvis du fortsetter samme dag med [Klargjøre til sekvensering på side 59](#), følg instruksjon for tining i avsnittet Klargjøre for protokoll.

Normalisere biblioteker

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

Klargjøring

- Klargjør følgende reagenser:
 - LNB1 – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - LNA1 – Bland ved å rotere.
 - EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - LNW1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyre.
 - LNS1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyren.
- Puls-vorteks LNB1 i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Vend LNB1-røret for å kontrollere at alle kulene er resuspendert.
- Gjenta puls-vorteks i 1 minutt hvis en pellet observeres.
- Bruk en dråpeteller satt til 800 µl for å pipettere LNB1 opp og ned 10 ganger for å sikre resuspensjon.
- Klargjør umiddelbart ny LNA1 + LNB1-hovedblanding i et kjegleformet rør.



FORSIKTIGHET

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

Tabell 30 LNA1 + LNB1-hovedblanding*

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

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 27](#) for beregninger.

- Roter LNA1 + LNB1-hovedblandingen. Legg til side for trinnet [Binde på side 57](#).
- Klargjør ny EE2 + HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 31 EE2 + HP3-elueringsblanding for Normaliser biblioteker*

Elueringsblandingskomponent	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se [Håndtering av reagenser på side 27](#) for beregninger.

8. Roter ny elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet [Eluere på side 58](#).
9. Hvis PL PCR-platen var oppbevart, tin til romtemperatur, sentrifuger ved $280 \times g$ i 1 minutt. Pipettere for å blande.
10. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BBN (Kulebasert normalisering).
11. Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

1. Roter LNA1 + LNB1-hovedblandingen.
2. Tilsett umiddelbart 45 µl LNA1 + LNB1-hovedblanding i hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen.
3. Kast gjenværende LNA1 + LNB1-hovedblanding.
4. Tilsett 20 µl av hvert bibliotek fra PL PCR-platen i tilsvarende brønn på BBN MIDI-platen.
5. Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
6. Rist ved 1800 o/min i 30 minutter.
7. Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen, og sett tilbake til oppbevaring.
8. Plasser BBN MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
9. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.

Vaske

1. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Fjern BBN MIDI-platen fra magnetstativet.
 - b. Tilsett 45 µl LNW1 i hver bibliotekbrønn.
 - c. Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
 - d. Rist ved 1800 o/min i 5 minutter.
 - e. Plasser BBN MIDI-platen på et magnetstativ i 2 minutter.
 - f. Hold platen på magnetstativet. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en dråpeteller satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn.
2. Vask kulene en *andre* gang.
3. Bruk en dråpeteller med fine spisser til å fjerne rester av supernatant fra hver brønn.

Eluere

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



FORSIKTIGHET

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

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

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 32 dager.

Klargjør for protokoll

Denne klargjøringen er nødvendig for å utføre protokolltrinnene som fører frem til sekvensering.

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

1. Fjern bibliotekfortynningsbufferen (HT1) fra oppbevaring ved -25 °C til -15 °C. Tin til romtemperatur. Hold kald etter tining.
2. Følg klargjøringsinstruksjonene i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)* for andre forbruksvarer i settet.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)

- NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykluser)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykluser)
3. Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (frys)-boks (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PhiX-kontroll	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur. Hold kald etter tining.	Klargjøre til sekvensering

Tabell 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20031123) i tillegg til TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (kjøleskap)-boks (PN 20140116)

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

Klargjøre til sekvensering

Hver DNA-sekvenseringskjøring bør inkludere en positiv kontroll og en NTC. NTC-ene sekvenseres gjentatte ganger etter behov, slik at hver kjøring inneholder en NTC. Hver kjøring omfatter en separat positiv kontroll.

Klargjøring

1. Gjennomgå retningslinjene for [Antall biblioteker og valg av indekser på side 28](#).
2. Merk et mikrosentrifugerør dHP3 (fortynnet HP3).
3. Merk et mikrosentrifugerør dPhiX (fortynnet PhiX).
4. Forvarm en varmeblokk til 96 °C for mikrosentrifugeprøverør.
5. Klargjør en isbøtte eller tilsvarende.

Fortynne og denaturere PhiX-kontrollen

1. Bland ved å rotere HP3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
2. Kombiner følgende volumer i dHP3-mikrosentrifugerøret:
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase-/DNase-fritt vann-
3. Bland ved å rotere dHP3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
4. Bland ved å vende eller rotere RSB.
5. Bland ved å rotere PhiX-kontrollen, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Kombiner følgende volumer i dPhiX-mikrosentrifugerøret:

- 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX-kontroll
7. Tilsett 10 µl dHP3 i dPhiX-røret.
 8. Kast dHP3-røret.
 9. Bland ved å rotere dPhiX-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 10. Denaturer ved å inkubere dPhiX ved romtemperatur i 5 minutter.
 11. Bland ved å rotere HT1.
 12. Tilsett umiddelbart 980 µl forhåndskjølt HT1 i dPhiX.
 13. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 14. Oppbevar dPhiX kaldt til det skal brukes i klargjøringen for den andre fortynningen.
Sluttkonsentrasjonen er 20 pM dPhiX.
 15. Sett PhiX, HP3 og RSB tilbake til oppbevaring.

Poole og denaturere biblioteker

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



FORSIKTIGHET

Sørg for å blande bibliotekbrønnene for optimal ytelse.

3. Merk et mikrosentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries).
4. Merk et mikrosentrifugerør PHL (Pooled HRD Libraries).
5. Overfør 10 µl av hvert normalisert OPD2-beriket DNA-bibliotek fra NL-platen til PDL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
6. Overfør 10 µl av hvert normalisert OPD3-beriket DNA HRD-bibliotek fra NL-platen til PHL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
7. Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
8. Bland ved å rotere hvert PDL- og PHL-rør.
9. Sentrifuger PDL- og PHL-rørene et kort øyeblikk.
10. Inkuber PDL- og PHL-rør i en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
11. Legg PDL og PHL-rør på is i 5 minutter.
12. Bland ved å rotere PDL- og PHL-rørene, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
13. Sett PDL- og PHL-rørene tilbake på is.

Klargjøre første fortynning

1. Merk et mikrosentrifugerør DIL1 (fortynning 1).
2. Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-røret.
3. Kast PDL-røret.
4. Tilsett 5 µl PHL i DIL1.
5. Tilsett 475 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortynning).
6. Bland ved å rotere DIL1-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
7. Kast PHL-røret.
8. **[Feilsøking]** Dersom det etter sekvensering observeres kvalitetskontrollfeil på kjøringsnivå eller systemisk bibliotek knyttet til kulebasert normalisering, gå videre til [Arbeidsflyt for feilsøking: Klargjør justert andre fortynning på side 61](#).

Klargjøre andre fortynning

1. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (fortynning 2).
2. Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
3. Kast DIL1-røret.
4. Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortynning).
5. Bland ved å rotere klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
6. Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
7. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
8. Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
9. Kast DIL2-røret.
10. Sentrifuger NL PCR-platen ved $280 \times g$ i 1 minutt, og lagre ved -25°C til -15°C i opptil 32 dager.
11. Gå videre til sekvensering.
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Arbeidsflyt for feilsøking: Klargjør justert andre fortynning

Bruk denne arbeidsflyten for feilsøking når det etter sekvensering observeres kvalitetskontrollfeil på kjøringsnivå eller systemisk bibliotek knyttet til kulebasert normalisering (se [Feilsøking på side 66](#) for mer informasjon). Klyngetettheter utenfor området $170\text{--}220\text{ K/mm}^2$ skal ikke justeres med mindre det er forbundet med en kvalitetskontrollfeil. Når du har fullført trinnet *Klargjør første fortynning*, klargjør du en ny fortynning ved hjelp av justerte DIL1- og HT1-volumer.

MERK Den justerte andre fortynningen brukes i henhold til bibliotekklargjøring. Etter at høy eller lav klyngetetthet forårsaker en ugyldig sekvenseringskjøring eller en ugyldig bibliotek kvalitetskontroll, kan påfølgende kjøring fra samme bibliotekklargjøring justeres ved hjelp av samme klyngetetthetsverdi. Kjøring fra en ny bibliotekklargjøring følger standardarbeidsflyten.

1. Bruk [Tabell 34](#) til å finne klyngetetthetsområdet (K/mm^2) inkludert verdien observert i sekvenseringskjøringen. Legg merke til det tilsvarende justerte volumet av DIL1 (μl) og HT1 (μl). Det kombinerte reagensvolumet er alltid 1700 μl , som samsvarer med det nominelle fortynningsvolumet.

Tabell 34 Volumjusteringer basert på klyngetetthet

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

2. Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør TDIL2 (feilsøkingsfortynning 2).
3. Overfør volumet av DIL1 fra [Tabell 34](#) til det tomme TDIL2-røret.
4. Kast DIL1-røret.
5. Tilsett volumet av forhåndskjølt HT1 fra [Tabell 34](#) til TDIL2-røret.
6. Bland ved å rotere klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
7. Tilsett 2,5 μl klargjort 20 pM dPhiX i TDIL2-røret.
8. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
9. Plasser 1300 μl TDIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser). For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.
10. Kast TDIL2-røret.

11. Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og oppbevar deretter ved -25 °C til -15 °C i opptil 32 dager.
12. Gå videre til sekvensering.
For mer informasjon, se *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

Tolking av resultater

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

På kjøringsnivået genereres følgende utdatafiler:

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

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

For detaljert analyseinformasjon, se *Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul (dokumentnr. 200080937)*.

Resultater for CDx

Det er tre mulige resultater per tiltenkt bruk av CDx:

- **Positiv** – En variant eller biomarkør er påvist (CDx).
- **Ikke påvist** – Ingen varianter eller biomarkører knyttet til den tiltenkte bruken av CDx er påvist i prøven. Tumortypen som velges for prøven, er egnet for CDx.
- **Intet resultat** – En bestemmelse av en variant- eller biomarkørstatus er ikke mulig av én eller flere av følgende årsaker:
 - Sekvenseringskjøringen oppnådde ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene.
 - Biblioteket bestod ikke de nødvendige kvalitetskontrollspesifikasjonene. For kvalitetskontrollkategorier som besto, ble ingen ledsagende diagnostiske varianter eller biomarkører detektert.
 - Biblioteket bestod ikke de nødvendige NTC- og positive kontrollspesifikasjonene.

Alle CDx-resultater rapporteres i avsnittet Companion Diagnostic Results (Resultater for CDx) i JSON-rapporten. Bare positive resultater er angitt i avsnittet Companion Diagnostic Results (Resultater for CDx) i PDF-rapporten.

Kvalitetskontroll

Sekvenseringskjøring, bibliotek og kontrollgyldighet bestemmes automatisk og rapporteres av TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-analysemodul. Se [Tabell 35](#) og [Tabell 36](#) for kvalitetskontrollmetrikk og spesifikasjoner som brukes for sekvenseringskjøring, bibliotek og kontroller. Hvis den positive kontrollen eller NTC ikke oppfyller spesifikasjonene, ugyldiggjør programvaren automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater. For detaljert analyseinformasjon, se *Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul (dokumentnr. 200080937)*. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-rapporten, som er tilgjengelig i PDF- og JSON-format, oppsummerer kvalitetskontrollresultater. Rapportfilene ligger i analysemappen. Se *Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul (dokumentnr. 200080937)* for plassering av analysemappen (inneholder PDF- og JSON-rapporter) og kjøringssmappen.

Ugyldige sekvenseringskjøringer og biblioteker skal gjentas. Mer informasjon om å gjenta sekvenseringskjøringer eller tester av biblioteker finnes under [Feilsøking på side 66](#). Utfør ytterligere kvalitetskontroll tiltak per laboratoriets kvalitetadmonstrasjonsystem i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser eller akkrediteringskrav.

Informasjon om nukleinsyrekvantifisering og minimumskrav til inngangsmaterialer finnes under [Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 20](#).

Tabell 35 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Kvalitetskontrollmetrikk for rapportresultat

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
Sekvenseringskjøring	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Prosentandelen av avlesninger som passerer filter (PF).	Sekvenseringskjøring ugyldiggjort. Ingen resultater rapportert for noen prøve i kjøringen.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Gjennomsnittlig prosentandel av basebetegnelser med kvalitetscore på Q30 eller høyere for Avlesning 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Gjennomsnittlig prosentandel av basebetegnelser med kvalitetscore på Q30 eller høyere for Avlesning 2.	

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
DNA-biblioteker	CONTAMINATION_SCORE	≤ 1457	Kontaminasjonscore basert på variantallfrekvensdistribusjonen (VAF-distribusjon) av SNP-er.	Ingen DNA-resultater rapportert.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Median fragmentlengde i prøven	Ingen BRCA små DNA-variantresultater rapportert.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (antall)	≥ 150	Median eksonfragment-dekning på tvers av alle eksonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Prosentandel av eksonbaser med 50X fragmentdekning.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Prosentandel kimære avlesninger.	Ingen BRCA store omorganiseringsresultater rapportert.
	GENE_SCALED_MAD (antall)	$0 \leq x \leq 0,134$	Medianen av absolutte avvik fra medianen av det normaliserte antallet for hver CNV-målregion.	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (antall)	$\geq 1,0$	Den mediane rå-bin-tellingen per CNV-mål.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	Prosent HRD-prober med 50X fragmentdekning.	Ingen GIS-resultater rapportert.
	EXCESSIVE_TF (antall)	≤ 0	Feilmodusmetrikk som indikerer om tumorfraksjonen er for stor og tumor- og normale signaler ikke lenger kan differensieres for beregning av GIS.	

* Tilfredsstillende resultater viser PASS (Bestått).

Tabell 36 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Kontrollmetrikk for rapportresultat

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon	Virkning av ikke oppfylte spesifikasjoner*
DNA-positiv kontroll	Sensitivitet for liten DNA-variant	51 av 54 spesifiserte varianter detektert	Programvaren ugyldiggjør automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater. Ingen BRCA små DNA-variantresultater rapportert.
	Genforsterkningssensitivitet	3 av 3 spesifiserte varianter detektert	Programvaren ugyldiggjør automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater. Ingen BRCA store omorganiseringsresultater rapportert.
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50	Programvaren ugyldiggjør automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater. Ingen GIS-resultater rapportert.
DNA-kontroll uten mal	MEDIAN_EXON_COVERAGE	≤ 8	Programvaren ugyldiggjør automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater. Ingen BRCA liten DNA-variant og BRCA store omorganiseringsresultater rapportert.
	MEDIAN_TARGET_COVERAGE (Median måldekning)	≤ 2	Programvaren ugyldiggjør automatisk pasientprøver basert på kontrollprøveresultater. Ingen GIS-resultater rapportert.

* Tilfredsstillende resultater viser PASS (Bestått).

Feilsøking

Bruk [Tabell 37](#) til å feilsøke problemer i arbeidsflyten. Dersom en sekvenseringskjøring eller bibliotekklargjøring for en prøve mislykkes to ganger, kan det være nødvendig med ytterligere feilsøking. Kontakt Illuminas tekniske støtte.

Før du utfører de anbefalte feilsøkingshandlingene, må du vurdere de to generelle årsakene til at biblioteker ikke består kvalitetskontrollspesifikasjonene (QC). Når DNA- biblioteker ikke består kvalitetskontrollen, er den underliggende årsaken vanligvis enten *prøve-* eller *brønnspecifikk* eller *systemisk* for arbeidsflyten.

Prøve- eller brønnspecifikke feil kan skyldes håndteringsfeil eller iboende prøvekvalitet. Systemfeil kan oppstå ved bruk, utstyr, reagenser eller reagenshåndtering og kan påvirke flere biblioteker. Selv om systemiske feil er mest sannsynlige når alle biblioteker ikke består kvalitetskontrollen, kan variasjon i prøvekvalitet føre til systemiske feil som bare påvirker et delsett av biblioteker eller ett enkelt bibliotek.

Analyser følgende metrikker for å identifisere den sannsynlige kilden til det ugyldige utfallet.

- Inspiser de totale PF-avlesningene (utvidet metrikk) for hvert bibliotek fra `MetricsOutput.tsv`. Lignende verdier indikerer et systemisk problem, mens lave totale PF-avlesninger for én eller noen få prøver, inkludert prøvene som ikke besto kvalitetskontroll for biblioteket, antyder et prøve- eller brønnproblem.

- Inspiser de totale PF-avlesningene for DNA-positiv kontroll i `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` og sammenlign metrikken med historiske verdier. En reduksjon i denne metrikken for en positiv kontroll kan være en indikasjon på et systemisk problem.

Hvis en sekvenseringskjøring ikke består kvalitetskontrollspesifikasjonene for kjøringen, er årsaken en systemisk feil.

Tabell 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Feilsøking

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sekvenseringskjøringen samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene for kjøring.	• Feil ved pooling • Feil ved fortynning • Problemer med klargjøring av sekvenseringsforbruksmateriell (for eksempel ikke tilstrekkelig tint, kondens/avfall på strømningscelle)	Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 59 .

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
	Kulebasert normalisering: høy klyngetetthet	Hvis det er mistanke om en oppført feil, korrigerer du problemet og sekvenserer bibliotekene på nytt fra PCR-platen Normalized Libraries (NL). Se Klargjøre til sekvensering på side 59. Hvis ingen av de andre oppførte feilene mistenkes, kan konsentrasjonen av kuler fra LNB1-reagensrøret ha forårsaket høy klyngetetthet. Dette kan skyldes utilstrekkelig kuleblanding. Finn klyngetetthetsverdien fra <code>RunCompletionStatus.xml</code> i kjøringsmappen. Det optimale området for klyngetetthet er 170–220 K/mm², men høyere verdier kan fortsatt produsere kjøring som består kvalitetskontrollspesifikasjonene. Hvis klyngetettheten er over det optimale området og sekvenseringskjøringen ikke besto kvalitetskontrollspesifikasjonene, kan bibliotekene fra PCR-platen for normaliserte biblioteker (NL) resekvenseres med og justeres til den andre fortynningen. Gjenta Klargjøre til sekvensering på side 59 og følg instruksjonene for feilsøking.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Feil med rapportgenerering eller generell instrumentfeil (nettverksfeil, feil ved lasting/lossing av reagenser osv.).	Programvare- eller instrumentproblem.	Se <i>Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul</i> (dokumentnr. 200080937) for hjelp med rapportgenerering. Kontakt Illumina tekniske støtte for å få mer hjelp.
DNA-biblioteket består ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene.	Krav for prøveinnmating ble ikke oppfylt.	Sørg for egnet prøveinngang, og gjenta bibliotekklargjøring fra Fragmenter gDNA-trinnet. Se Prøvekrav på side 20 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 20 .
	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten.	Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illumina tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. - Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 59. - Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Fragmentere gDNA på side 35.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
DNA-biblioteket består ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene (fortsett).	CONTAMINATION_SCORE-kriteriene er ikke oppfylt.	Informasjon om hvordan krysskontaminasjon unngås, finnes under Advarsler og forholdsregler. Gjennomgå plateoppsett og bibliotekindeksering for å sikre at prøver med samme indeks ikke ble sekvensert sammen. Start bibliotekklargring fra begynnelsen av arbeidsflyten for påvirkede biblioteker. Se Fragmentere gDNA på side 35. Det kan ha forekommet kontaminasjon under prøveekstraksjonen. Det kan være nødvendig å gjenta ekstraksjonen for å kontrollere at prøven ikke er kontaminert.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
	Prøven kan være altfor fragmentert eller ha nukleinsyreskade som påvirker muligheten til å generere tilstrekkelige unike biblioteker.	Gjennomgå Innstillinger for ultralydinstrumentkonfigurasjon for DNA-fragmentering på side 17 og ultrasonikatorprodusentens innstillinger for bruk og drift (herunder vannivå og rørtype). Sørg for egnet prøveinngang i analysen. Se Prøvekrav på side 20 og Nukleinsyreekstraksjon, -kvantifisering og -lagring på side 20. En ny prøveekstraksjon og/eller gjentakelse av Fragmentere gDNA-trinnet kan være nødvendig hvis prøven er altfor fragmentert eller skadet.
	• Feil ved pooling. • Feil ved fortynning. • Ufullstendig varmedenaturering av PDL/PHL.	Utelukk DNA-relaterte årsaker som er oppført ovenfor (f.eks. prøveinnmating, prøvekvalitet, utstyr). Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 59.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
DNA-biblioteket består ikke kvalitetskontrollspesifikasjonene (fortsett).	Kulebasert normalisering (lav klyngetetthet).	Hvis ingen av de andre mulige årsakene til kvalitetskontrollfeil i bibliotek mistenkes, kan konsentrasjonen av kuler fra LNB1-reagensrøret ha forårsaket lav klyngetetthet på grunn av utilstrekkelig blanding. Finn og registrer klyngetetthetsverdien fra <code>RunCompletionStatus.xml</code> i kjøringsmappen. Hvis klyngetettheten er under 170 K/mm ² og det er mistanke om en systemisk kulebasert normalisering (inkludert bevis fra totale PF-avlesninger for de positive kontrollene), følger du sekvensbiblioteker fra PCR-platen Normalized Libraries (NL) og følger instruksjonene for en justert andre fortykning. Se Klargjøre til sekvensering på side 59 og Arbeidsflyt for feilsøking: Klargjør justert andre fortykning på side 61 .
	Feil i arbeidsflyten for bibliotekklargjøring under eller før indeks-PCR-trinnet.	Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Fragmentere gDNA på side 35 .
	- Feil bruk av anrikningsprober. - Feil i arbeidsflyten for bibliotekklargjøring under eller etter første hybridiseringsstrinn.	En systemisk probesammenslåingsfeil (f.eks. bytte av probesammenslåinger) kan føre til normale totale passerende filteravlesninger, men median eksondekning ikke består kvalitetskontroll. Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Fragmentere gDNA på side 35 .

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Feil i positiv kontroll.	Kravene til prøveinngang for den positive kontrollen ble ikke oppfylt.	Sikre relevant inngang i analysen. Gjennomgå plateoppsettet, og kontroller at de riktige reagensene (prober, indekser) er i de riktige brønnene. Kontroller at den positive kontrollprøven oppbevares i henhold til etiketten. For alle prøver som deler den positive kontrollen: Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstysrfeilen oppsto. Kontakt Illumina tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. - Sekvenser biblioteker fra Normaliserte biblioteker (NL) PCR-platen på nytt. Se Klargjøre til sekvensering på side 59. - Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Fragmentere gDNA på side 35.
	Bruks- eller utstysrfeil i analysearbeidsflyten.	
NTC-feil.	Det forekom krysskontaminasjon eller kontaminasjon av arbeidsområdet.	Gå gjennom avsnittet Advarsler og forholdsregler for informasjon om dekontaminasjon av arbeidsområder og hvordan unngå krysskontaminering. Gjennomgå plateoppsett og bibliotekindeksering for å sikre at prøver med samme indeks ikke ble sekvensert sammen. Gjenta bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten for alle biblioteker som deler no-template-kontroll (NTC).
	Feil indeksering av bibliotek.	

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Positive og/eller negative kontroller i sekvenseringskjøringen ble analysert som ikke-kontrollprøver.	Feil tilordning av prøvetype under oppsett av sekvenseringskjøring.	Sett analysen tilbake i kø med kontroller som er riktig identifisert som instruert i Veiledning for analysemodularbeidsflyt (se <i>Arbeidsflytveiledning for Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)-analysemodul (dokumentnr. 200080937)</i>).

Ytelseskarakteristikker

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er en analyse som muliggjør vurdering av HRD ved hjelp av DNA ekstrahert fra FFPE-tumorvevsprøver fra eggstokkreftpasienter. Den bruker to NGS-paneler. Ett panel brukes til deteksjon av skadelige og mistenkte skadelige endringer i BRCA1- og BRCA2-gener, inkludert små DNA-varianter og store omorganiseringer. Et annet NGS-panel brukes til å måle genomisk ustabilitet som rapporteres som GIS. BRCA-positiv er definert som påvisning av en skadelig eller mistenkt skadelig endring i enten BRCA1- eller BRCA2-gener. GIS-positiv er definert som GIS $\geq$ 42. HRD-positiv er definert som BRCA-positiv og/eller GIS-positiv.

FFPE-prøver med spesifikke CDx-positive varianter ble inkludert i studiene.

Tosidig 95 % konfidensintervall (CI) beregnet via Wilson-scoremetoden med mindre annet er oppgitt.

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

Tabell 38 Metrikkdefinisjoner

Begrep	Definisjon
Positivt prosentsamsvar (PPA)	Prosentandelen av positive resultater for sammenligningsmetode der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er positive.
Negativt prosentsamsvar (NPA)	Prosentandelen av negative resultater for sammenligningsmetoden, der TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er negative.
Prosent positiv betegnelse (PPC)	Prosentandel av observasjoner som er positive for et mål blant observasjoner som er forventet å være positive for målet.
Prosent negativ betegnelse (PNC)	Prosentandel av observasjoner som er negative for et mål blant observasjoner som er forventet å være negative for målet.
n/N	Antall positive eller negative observasjoner (n) delt på de totale observasjonene (N) for å beregne henholdsvis PPC eller PNC. Verdiene av n og N kan være på forskjellige nivåer (f.eks. variant eller gen) eller kombinert på tvers av en gruppe (f.eks. SNV-er).
Standardavvik (SD)	Et mål på variasjonsmengden av verdiene til en variabel om gjennomsnittet.
Prosent variasjonskoeffisient (%CV)	Standardavvik dividert med gjennomsnittet som en prosentandel.

Nøyaktighet

Nøyaktigheten til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen for deteksjon av HRD hos pasienter med eggstokkreft ble demonstrert ved å vurdere samsvar mellom HRD-status, GIS-status og BRCA-statusresultater

mellom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og en validert NGS-basert sammenligningsanalyse. Nøyaktighet ble estimert i forhold til den ortogonale metoden; PPA, NPA og tilhørende tosidig 95 % Wilson-score CI ble beregnet.

175 FFPE DNA-prøver for eggstokkreft ble testet med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og den ortogonale metoden. Én prøve hadde ugyldige TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater, og en annen prøve hadde ugyldige sammenligningsanalyseresultater. Evaluerbart datasett for GIS- og HRD-status var 173 prøver. Det evaluerbare datasettet for BRCA-status var 169 på grunn av eksklusjon av fire ytterligere prøver med BRCA-varianter utenfor TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens måleområde. Samsvarsanalysene basert på gyldige testresultater er vist i [Tabell 39](#), [Tabell 40](#) og [Tabell 41](#).

Tabell 39 Samsvar mellom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og sammenligningsmetoden for deteksjon av HRD-status

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

Tabell 40 Samsvar mellom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og sammenligningsmetoden for deteksjon av GIS-status

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

Tabell 41 Samsvar mellom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og sammenligningsmetoden for deteksjon av BRCA-status

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

Reproduserbarhet

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens reproduserbarhet og repeterbarhet ble evaluert på tre eksterne teststeder med to operatører per sted, to replikater innen kjøring, tre loter og tre ikke-påfølgende dager. På hvert av de tre stedene utførte to operatører uavhengig testing på separate NextSeq 550Dx-instrumenter. Testingen ble utført med et reproduserbarhetspanel med 27 medlemmer som inneholdt DNA ekstrahert fra FFPE-ovarievevsprøver med kjente BRCA1- og BRCA2-mutasjoner og/eller GIS.

Av de 27 panelmedlemmene ble 16 panelmedlemmer målrettet for små DNA-varianter i BRCA-gener som inkluderer: SNV-er, varianter i homopolymerregioner ≥ 5 bp, insersjoner og delesjoner < 10 bp, og insersjoner og delesjoner ≥ 10 bp. For BRCA LR-varianttypen ble to panelmedlemmer brukt for BRCA LR-varianter < 3 eksoner og ett panelmedlem for BRCA LR-variantene ≥ 3 eksoner. For GIS representerte tre panelmedlemmer status for høy GIS (+), tre panelmedlemmer representerte GIS (-), to panelmedlemmer representerte lav GIS (+), og ett av panelmedlemmene som allerede representerte LR-variantene < 3 eksonnivå representerte også ett Low GIS (+)-medlem. På hvert sted testet hver operatør panelmedlemmene i løpet av tre ikke-påfølgende dager, og genererte seks observasjoner per mål per panelmedlem. Fra alle de 3 stedene ble det generert 36 observasjoner per panelmedlem (tre steder $\times$ to operatører/instrumenter $\times$ 3 dager $\times$ to replikater innenfor kjøring).

PPC og PNC for målrettede panelmedlemmer ble fastslått. Analyser ble utført for å estimere PPC og PNC (med tilknyttede 95 % CI-er) ved å kombinere resultatene fra seks operatører på tre steder. For hver målrettede liten DNA-variant og LR-variant ble TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseobservasjoner i panelmedlemmer som var forventet å være negative for målvarianten, kombinert for å beregne PNC. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyseobservasjoner i GIS (-)-panelmedlemmer ble kombinert for å beregne PNC for GIS (-)-panelmedlemmer.

Små DNA-varianter i BRCA

PPC-verdier for både BRCA-panelmedlemmer med små DNA-varianter på høyt nivå ($2-3 \times C95$) og lavt nivå ($1-1,5 \times C95$) var alle 100 % (Tabell 42). PNC-verdier for panelmedlemmer av BRCA små DNA-varianter var også alle 100 % (Tabell 43).

Tabell 42 PPC for målrettede BRCA små DNA-varianter etter variantnivå og variantklasse

Variantnivå	Variantklasse	Målrettet variant	Gjennomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N)	95 % CI
Høy	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)
	Varianter i homopolymerer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0,248	100 (34/34)	(89,8, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0,239	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Innsetting eller sletting (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0,166	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0,153	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Innsetting eller sletting (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0,189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,141	100 (33/33)	(89,6, 100)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	0,087	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 c.80+1G>A	0,087	100 (36/36)	(90,4, 100)
Lav	Varianter i homopolymerer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	0,147	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	0,142	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Innsetting eller sletting (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0,121	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0,122	100 (35/35)	(90,1, 100)
	Innsetting eller sletting (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0,109	100 (35/35)	(90,1, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,111	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabell 43 PNC for målrettede BRCA små DNA-varianter etter variantklasse

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

Variantklasse	Målrettet variant	PNC (%) (n/N)	95 % CI
Innsetting eller sletting (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

Tabell 44 viser varianskomponentanalysen etter variasjonskilde for høye og lave nivåer for hver BRCA liten DNA-variantklasse. Gjennomsnittlig VAF på tvers av de målrettede BRCA små DNA-variantene på høyt nivå varierte fra 0,121 til 0,248, og målrettede BRCA små DNA-varianter på lavt nivå varierte fra 0,087 til 0,147. Den totale SD på tvers av de målrettede BRCA små DNA-variantene varierte fra 0,019 (11,4 % CV) til 0,041 (28,7 % CV) for BRCA små DNA-varianter på høyt nivå, og fra 0,016 (18,9 % CV) til 0,043 (30,1 % CV) for små BRCA-DNA-varianter på lavt nivå.

Tabell 44 Varianskomponentanalyse av VAF for målrettede små DNA-varianter

Variantnivå	Variantklasse	Målrettet variant	Nei	Gjennomsnittlig VAF	Sted-SD (% CV)	Operatør-/instrument-SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Repereterbarhet SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Høy	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)
	Homopolymervarianter ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	34	0,248	0,000 (0,0)	0,011 (4,3)	0,008 (3,3)	0,000 (0,0)	0,025 (10,1)	0,029 (11,5)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0,239	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,000 (0,0)	0,041 (17,0)	0,041 (17,1)
	Innsetting eller sletting < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0,166	0,006 (3,7)	0,005 (3,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,3)	0,019 (11,4)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	36	0,153	0,008 (5,1)	0,000 (0,0)	0,013 (8,5)	0,000 (0,0)	0,020 (12,9)	0,025 (16,3)
	Innsetting eller sletting ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	36	0,189	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (3,3)	0,015 (8,0)	0,033 (17,5)	0,037 (19,6)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	33	0,141	0,000 (0,0)	0,013 (9,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,038 (27,1)	0,041 (28,7)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0,087	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,016 (18,7)	0,016 (18,9)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0,087	0,003 (3,7)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (22,0)	0,019 (22,3)
Lav	Homopolymervarianter ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	36	0,147	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,021 (14,0)	0,021 (14,1)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0,142	0,011 (8,0)	0,000 (0,0)	0,010 (7,2)	0,015 (10,7)	0,037 (26,0)	0,043 (30,1)
	Innsetting eller sletting < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0,121	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (3,7)	0,017 (14,0)	0,017 (14,5)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	35	0,122	0,004 (3,4)	0,007 (5,6)	0,000 (0,0)	0,006 (5,0)	0,021 (16,9)	0,023 (18,8)
	Innsetting eller sletting ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	35	0,109	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (6,5)	0,006 (5,5)	0,026 (24,3)	0,028 (25,8)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	36	0,111	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,029 (26,0)	0,030 (27,2)

Store omorganiseringsvarianter i BRCA

PPC-verdier for de målrettede BRCA LR-ene var 100 % (29/29) for BRCA2 LR $\geq$ 3 eksoner, 97,2 % (35/36) for BRCA2 LR < 3 eksoner og 94,3 % (33/35) for BRCA1 LR < 3 eksoner (Tabell 45). PNC-verdier for de målrettede BRCA LR-ene var 98,9 % (630/637) for BRCA1 og 100 % (607/607) for BRCA2 (Tabell 46).

Tabell 45 PPC for målrettede BRCA LR-er etter variantklasse

Variantklasse	Målrettet variant	Gjennomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
LR $\geq$ 3 eksoner	BRCA2 TAP	0,448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 eksoner	BRCA2 TAP	0,602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	BRCA1 TAP	0,680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tabell 46 PNC for målrettede BRCA LR-er

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

Tabell 47 viser varianskomponentanalysen etter variasjonskilde for hver BRCA LR-klasse. Gjennomsnittlig VAF for LR $\geq$ 3 eksonvariant var 0,448 med et totalt SD på 0,026 (5,7 % CV). Gjennomsnittlig VAF for LR < 3 eksonvarianter varierte fra 0,602 til 0,680, og det totale SD varierte fra 0,038 (6,3 % CV) til 0,079 (11,6 % CV).

Tabell 47 Varianskomponentanalyse av VAF i målrettede BRCA LR-er

Variantklasse	Målrettet variant	Nei	Gjennomsnittlig VAF	Sted-SD (% CV)	Operatør / Instrument SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Repeterbarhet SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
LR $\geq$ 3 eksoner	BRCA2 TAP	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 eksoner	BRCA2 TAP	36	0,602	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,015 (2,5)	0,000 (0,0)	0,035 (5,8)	0,038 (6,3)
	BRCA1 TAP	35	0,680	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,048 (7,1)	0,000 (0,0)	0,062 (9,2)	0,079 (11,6)

Genomisk ustabilitetsscore (GIS)

PPC-verdier var 100 % for høy GIS (+)-panelmedlemmer. Lave GIS (+)-panelmedlemmer hadde PPC-verdier fra 94,4 % til 100 % (Tabell 48). PNC-verdier var 100 % på tvers av alle GIS (-)-panelmedlemmer (Tabell 49).

Tabell 48 PPC for GIS etter målrettet GIS-status og panelmedlem

Målrettet GIS-status	Målrettet GIS	Gjennomsnittlig GIS	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
Høy GIS (+)	69,8	70,2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	59,5	60,1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	63,7	61,7	100 (36/36)	(90,4, 100)

Måltrettet GIS-status	Måltrettet GIS	Gjennomsnittlig GIS	PPC (%) (n/N)	95 % CI*
Lavt GIS (+)	47,2	46,3	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	52,7	53,1	100 (36/36)	(90,4, 100)
	53,0	52,5	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabell 49 PNC for GIS-negative måltrettede panelmedlemmer

Måltrettet GIS-status	Måltrettet GIS	Gjennomsnittlig GIS	PNC (%) (n/N)	95 % CI*
GIS (-)	24,5	23,3	100 (36/36)	(90,4, 100)
	(19,2)	18,2	100 (36/36)	(90,4, 100)
	19,5	21,0	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabell 50 viser varianskomponentanalysen etter variasjonskilde for hvert måltrettede panelmedlem med høy GIS (+), lav GIS (+) og GIS (-). Gjennomsnittlig GIS på tvers av GIS-måltrettede panelmedlemmene varierte fra 60,1 til 70,2 for høy GIS (+), fra 46,3 til 53,1 for lav GIS (+), og fra 18,2 til 23,3 for GIS (-). Den totale SD på tvers av de måltrettede GIS-panelmedlemmene varierte fra 2,5 (3,5 % CV) til 3,2 (5,2 % CV) for høy GIS (+), fra 1,5 (2,9 % CV) til 3,8 (7,2 % CV) for lav GIS (+) og fra 2,5 (11,7 % CV) til 3,3 (14,1 % CV) for GIS (-)-panelmedlemmer.

Tabell 50 Varianskomponentanalyse av GIS for måltrettede panelmedlemmer

Måltrettet GIS-status	Måltrettet GIS	N	Gjennomsnittlig GIS	Sted-SD (% CV)	Operatør / Instrument SD (% CV)	Dag-SD (% CV)	Lot-SD (% CV)	Repeterbarhet SD (% CV)	Totalt SD (% CV)
Høy GIS (+)	69,8	36	70,2	0,0 (0,0)	1,2 (1,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,2 (3,1)	2,5 (3,5)
	59,5	36	60,1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (1,7)	0,0 (0,0)	2,7 (4,4)	2,8 (4,7)
	63,7	36	61,7	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,9 (1,5)	0,0 (0,0)	3,1 (5,0)	3,2 (5,2)
Lavt GIS (+)	47,2	36	46,3	0,0 (0,0)	1,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,7 (1,6)	2,8 (6,1)	3,4 (7,3)
	52,7	36	53,1	0,9 (1,7)	1,2 (2,3)	0,0 (0,0)	0,4 (0,8)	3,5 (6,5)	3,8 (7,2)
	53,0	36	52,5	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,5 (2,9)	1,5 (2,9)
GIS (-)	24,5	36	23,3	0,9 (3,7)	1,6 (6,9)	1,6 (7,0)	0,9 (3,7)	2,0 (8,7)	3,3 (14,1)
	(19,2)	36	18,2	0,7 (3,7)	0,0 (0,0)	0,6 (3,5)	0,1 (0,4)	2,4 (13,4)	2,6 (14,4)
	19,5	36	21,0	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,6 (3,0)	1,3 (6,3)	2,0 (9,4)	2,5 (11,7)

Grense for blank

Prosentandelen av falske positive (av de totale forventede negativene) ble vurdert ved replikattesting av FFPE-godartet tilstøtende eggstokkvev. Vevet var forventet å være GIS-negativt og inneholder ikke skadelige eller mistenkte skadelige BRCA1- og BRCA2-mutasjoner (små DNA-varianter og LR-er). Sju godartede FFPE DNA-prøver fra eggstokkene ble kjørt i duplikat med to operatører over tre dager for hver av de to reagenslotene i 8-pleksformat. Et delsett av prøver ble regruppet og resekvensert i et format med et 3x-format for å evaluere falskt positive med flere multiplekse konfigurasjoner støttet av denne enheten. Totalt var det 168

mulige observasjoner. Prosentandelen av falskt positive ble beregnet på posisjonsnivå for BRCA små DNA-varianter (omkring 3 millioner posisjoner), på gennivå for BRCA LR-er, og på prøvenivå for GIS. Prosentandelen av falskt positive for DNA-varianttyper er vist i [Tabell 51](#).

Tabell 51 Falskt positive etter varianttype

Varianttype	Falskt positive*
BRCA Små DNA-varianter	0 % (0/3 076 657)
BRCA LR	0 % (0/384)
GIS	0 % (0/192)

* Nevnere er totalt 8-pleks- og 3-plekskjøringer.

Deteksjonsgrense

Påvisningsgrensen (Limit of Detection – LoD) for BRCA små DNA-varianter (SNV-er, insersjoner eller delesjoner ≥ 10 bp, insersjoner eller delesjoner < 10 bp, varianter i homopolymerregioner ≥ 5 bp), BRCA LR-er < 3 eksoner og ≥ 3 eksoner, og GIS ble bestemt i FFPE DNA-prøver for kreft. LoD er den laveste analyttverdien som kan detekteres konsekvent (95 % treffrate eller en type II-feil på 5 %). LoD for GIS ble definert som det laveste tumorinnholdet som oppnår ≥ 95 % GIS-påvisning og for små BRCA-DNA-varianter og LR-er som variantallelfrekvens (VAF). FFPE DNA-prøver for eggstokkreft ble brukt for BRCA små DNA-varianter, GIS og BRCA LR ≥ 3 eksoner. En FFPE DNA-prøve for brystkreft ble brukt for BRCA LR < 3 eksoner på grunn av utilgjengeligheten av FFPE-vev for eggstokkreft. Prøver ble fortynnet til flere testnivåer, med 12 observasjoner for hvert testnivå per reagenslot per variant, generert av flere operatører på tre ikke-påfølgende dager ved bruk av to reagensloter. Den større LoD på tvers av de to reagenslotene ble tatt som deteksjonsgrense for varianten ([Tabell 52](#)).

Tabell 52 Deteksjonsgrense for BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er, GIS

Varianttype	Variantklasse	C95
BRCA Små DNA-varianter	SNV	0,05 VAF
	Innsettinger eller delesjoner ≥ 10 bp	0,06 VAF
	Innsettinger eller delesjoner < 10 bp	0,07 VAF
	Varianter i homopolymer region ≥ 5 bp	0,07 VAF
BRCA store omorganiseringer	LR < 3 eksoner	0,61 VAF
	LR ≥ 3 eksoner	0,46 VAF
GIS	GIS	33 % tumorinnhold

Forstyrrende stoffer

Virkingen av potensielle endogene og eksogene stoffer på TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens ytelse ble evaluert med det endogene stoffet (hemoglobin) som ble tilsatt i prøver under nukleinsyreekstraksjonsprosessen, samt eksogene stoffer (etanol, proteinase K, vaskebuffer, parafin, xylen og overflødig indeksprimere) som ble tilsatt i den rensede nukleinsyren før bibliotekklargjøring. Fire replikater av prøvebibliotekene ble generert av én eller flere operatører. For alle stoffer ble 10 FFPE-prøver av eggstokkreft brukt til analyse av BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er og GIS. Effekten av nekrose ble også vurdert på et annet sett med tre FFPE-prøver av eggstokkreft med et område av nekrotisk vev (10–20 %). Det var en makrodissekert, ingen nekrose-kontroll for hver nekroseprøve. Fire replikater av DNA-biblioteker og deres kontroller ble behandlet sammen. For alle interferenter ble prøvereplikater per stoff sammenlignet med deres respektive kontrollreplikater. Hemoglobin (4 mg/ml), etanol (5 %), proteinase K (2 x representativ ekstraksjonsmetodekonsentrasjon), vaskebuffer (2,5 %), parafin (25 % av det homogeniserte fordøyde vevet), xylen (0,0001 %), indeksprimere (30 % overskudd) interfererer ikke med deteksjonen av BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er og GIS. BRCA liten DNA-variant VAF-nivåer og GIS var upåvirket av tilstedeværelsen av noen av de testede interferentene. Tilstedeværelse av nekrotisk vev opptil 20 % forstyrret ikke BRCA små DNA-varianter og GIS. BRCA LR-er ble ikke evaluert for nekrose på grunn av utilgjengeligheten av en FFPE-prøve for nekrotisk eggstokkreft som inneholdt en BRCA LR-variant.

Guardbanding ved innmatingstitrering av nukleinsyre

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) krever en fast innmating av 40 ng DNA-prøve. Analysens ytelse ble evaluert ved hjelp av ni DNA-prøver ekstrahert fra FFPE-vev i eggstokkene for å etablere toleranser for variasjon i nukleinsyreinnmating som kan føre til analysefeil eller negativt innvirkning på analysens ytelse. Hver FFPE-prøve inneholdt én eller flere små BRCA-DNA-varianter, BRCA LR-er eller GIS, og ble testet ved fem innmatingsnivåer (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominell], 60 ng og 100 ng) i triplikat. Resultatene viste at BRCA-deteksjon av små DNA-varianter, BRCA LR-betegnelse og GIS-status ikke ble påvirket av forskjell i inngangsmengde.

Resultatene viste også at nukleinsyreinnmatninger to ganger under den nominelle tilstanden hadde et økt antall kvalitetskontrollfeil som førte til færre prøver evaluert for variantbetegnelse. På innmatingsnivået på 20 ng ble det oppnådd en bibliotekgyldighetsrate på 55,5 % på grunn av feil i prosentvis eksondekning ved 50X (PCT_EXON_50X) og median eksondekning (MEDIAN_EXON_COVERAGE). BRCA liten DNA-variant VAF og GIS ble ikke påvirket på 20 ng innmatingsnivå.

Krysskontaminasjon

Krysskontaminasjonsstudien ble gjennomført for å vurdere om det forekom falske positive resultater var på grunn av brønn-til-brønn-kontaminasjon under prøvebibliotekklargjøringen og kjøring-til-kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer for -analysen. Analyse ble utført for BRCA små DNA-varianter, BRCA LR og GIS. Biblioteker ble klargjort fra karakteriserte FFPE-prøver av eggstokkreft i et sjakkbrettoppsett med vekslende prøver for å evaluere brønn-til-brønn-kontaminasjon, og med vekslende indekser for å evaluere

kjøring-til-kjøring-kontaminasjon ved etterfølgende sekvensering på samme NextSeq 550Dx-instrumentet. Krysskontaminasjonsstudien viste en kontaminasjonsandel på 0,8 % (2/252 kontamineringshendelser), noe som ble observert ved å undersøke de påviste variantene i hver prøve. Ingen kontaminasjonshendelser ble funnet ved å analysere mottakerbiblioteker basert på variantbetegnelse for BRCA små DNA-varianter og BRCA LR. De to observerte kontaminasjonshendelsene var falskt positive for GIS i GIS-mottakerprøver på grunn av intrinsisk GIS-variasjon, og GIS for disse to prøvene var nær beslutningsterskelen.

Studien demonstrerte at TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen forventes å ha en lav forekomst av krysskontaminasjon fra brønn til brønn eller kjøring til kjøring. Disse resultatene sammen med kontaminasjonsmetrikkene i programvaren reduserer risikoen for falske variantresultater på grunn av prøvekontaminering.

Evaluering av ekstraksjonssett for nukleinsyre

Tre kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett ble evaluert med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Settene hadde forskjellige deparafiniseringsmiddel og nukleinsyrebindingstrinn ([Tabell 53](#)). Sett 3 var det dominerende ekstraksjonssettet som ble brukt til å fastslå TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-ytelsen.

Fem FFPE-prøver fra eggstokkene ble utsatt for nukleinsyreekstraksjon (tre sett x to operatører x tre dager x to replikater) for å oppnå DNA (totalt 36 observasjoner). Kvalitativ analyse viste at det ikke var noen merkbar forskjell i variantbetegnelse for noen av varianttypene (BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er, GIS), da alle variantobservasjoner hadde PPC-verdier > 97 %. Kvantitativ analyse viste ingen signifikant forskjell knyttet til sett for BRCA liten DNA-variant VAF og GIS.

Tabell 53 Settkarakteristikker

Sett	Settnavn	Deparafiniseringsmiddel	Nukleinsyrebinding
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE Vev	Xylen	Kolonne
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Mineralolje	Magnetkuler
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Proprietær deparafiniseringsløsning	Kolonne

Reagensstabilitet

Sanntidsstabilitet

Sanntidsstabilitet ble evaluert ved hjelp av seks FFPE-vevsprøver av eggstokkreft. Tre reagensloter ble testet på seks tidspunkter med lignende trinn (3 måneder, 6 måneder, 9 måneder, 13 måneder, 19 måneder og 25 måneder). To operatører utførte bibliotekklargjøringshendelser for hver lot, inkludert tre replikater av hver prøve, for totalt seks replikater per lot. For målrettede BRCA små DNA-varianter var samlet PPC 100 %, for målrettet BRCA LR-aggregat var PPC ≥ 92 %, og for GIS-aggregat var PPC ≥ 83 %. I tillegg var det ingen signifikante forskjeller knyttet til tid for GIS eller BRCA liten DNA-variant VAF.

Settets stabilitet i bruk

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysesettets stabilitet i bruk ble evaluert under standard bruksvilkår under holdbarhetstiden for å støtte flergangsbruk av sett. De frosne komponentene i reagenssettet ble utsatt for flere frys-/tinesykluser, og nedkjølte reagenser ble brakt opp til romtemperatur og testet for å støtte opptil fire bruk av settet. Alle kriteriene for godkjenning av kvalitetskontrollen ble oppfylt for alle testede frys-/tinesykluser og tidspunkter. Variantbetegnelse ble vurdert for BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er og GIS. Resultatene støtter opptil fire frys-/tinesykluser av settet. I tillegg ble ett reagenssett brukt til å klargjøre totalt 24 DNA-prøver av én operatør som viste at det er tilstrekkelig reagensvolum for 24 DNA- og 24 HRD-biblioteker.

Transportstabilitet

Settets transportstabilitet for TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen ble evaluert ved hjelp av ni FFPE-prøver for eggstokkreft for å vise funksjonaliteten til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-reagenssettene etter eksponering for simulerte fordelingsforhold. Åtte FFPE-prøver av eggstokkreft ble brukt til å vise funksjonalitet etter reagenssetteksponering for simulerte internasjonale sommer- og vintertemperaturprofiler. Funksjonell testing ble utført etter eksponering ved hjelp av ovennevnte prøver og besto av seks til 12 replikater av hver prøve per tilstand. De fysiske egenskapene til settene ble også observert og funnet å opprettholdes etter distribusjon for alle testkasus. Funksjonell testing konkluderte med at forsendelse ikke påvirket variantbetegnelsen negativt for små BRCA-DNA-varianter (PPC $\geq 96\%$), BRCA-LR-er (PPC $\geq 94\%$) og GIS (PPC = 100 %) i forhold til kontrolltilstanden.

Prøvestabilitet

Nukleinsyrestabilitet

Stabiliteten til nukleinsyrer (DNA) og deres tilknyttede kvantifisering for bruk med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen ble evaluert ved hjelp av FFPE-vevprøver fra eggstokkreft. FFPE-blokker ble snittet, og DNA ble ekstrahert. Ekstrahert nukleinsyre ble grundig blandet, kvantifisert, kontrollert for nukleinsyre kvalitet og alikvotert i to sett med engangsrør som skulle fryses for to tidspunkter: T0 (kontroll) og T1 (for å støtte 28 dager). Alt ekstrahert DNA ble oppbevart ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil det ble testet ved T0 eller T1 med flere replikater og operatører. T1 ble sammenlignet med T0 for BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er og GIS. Dataene indikerer at nukleinsyrer og deres tilhørende kvantifisering for bruk med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen er stabile i opptil 28 dager når de oppbevares ved anbefalte temperaturer ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Bibliotekstabilitet

Stabiliteten til biblioteker som bruker hvert av de fem sikre stoppepunktene for analysen (se [Tabell 54](#)), ble evaluert ved hjelp av flere FFPE-vevsprøver med eggstokkreft og én FFPE-vevsprøve med brystkreft. Kontrollbiblioteker (T0, ingen stoppepunkter) ble sekvensert umiddelbart på slutten av arbeidsflyten. Alikvoter fra de samme bibliotekene ble holdt ved stoppepunktene ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ for tiden (T1) for å støtte dagene

oppført i [Tabell 54](#). T1 ble sammenlignet med T0 for BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er og GIS. Dataene indikerer at biblioteker generert fra TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen er stabile i henhold til bruksanvisningen.

Tabell 54 Biblioteklagringstider

Bibliotek -type	Plate	Antall dager
Fragmentert -gDNA	LP PCR	≤ 7
Preanriket	ALS PCR	≤ 30
Postanriket	ELU2 PCR	≤ 7
Postanriket -PCR	PL PCR	≤ 30
Normalisert	NL PCR	≤ 32

Stabilitet for objektglassmontert FFPE-vev

Stabiliteten til objektglassmonterte FFPE-vev for bruk sammen med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen ble evaluert ved å snitte FFPE-blokker (5 µm snitt) fra ti FFPE-vevsprøver av eggstokkreft, montert på objektglass, etterfulgt av oppbevaring ved romtemperatur for (22 °C) for 2 tidspunkter: T0 (kontroll) og T1 (for å støtte 28 dager). Nukleinsyremateriale ble kvantifisert og deretter behandlet gjennom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen innen 24 timer for hvert tidspunkt. På hvert tidspunkt ble flere replikater per prøve testet av flere operatører. T1 ble sammenlignet med T0 for BRCA små DNA-varianter, BRCA LR-er og GIS. Variantbetegnelse ble vurdert. Dataene indikerer at objektglassmontert FFPE-vev for bruk med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) er stabilt ved romtemperatur i opptil 28 dager.

Klinisk HRD-ytelsesbrostudie

For å validere TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen som en CDx for utvalget av pasienter med eggstokkreft for behandling med LYNPARZA (olaparib), ble restprøver fra pasienter som er inkludert i den kliniske studien PAOLA-1 (NCT02477644), testet for å støtte en klinisk brostudie.

Studien ble utført for å vurdere samsvaret mellom HRD- status mellom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen og den kliniske studieanalysen (CTA) som ble brukt i PAOLA-1, og for å vurdere den kliniske effekten av olaparib hos de HRD-positive pasientene identifisert av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen. PAOLA-1 var en multisenter, fase III, randomisert, dobbeltblind, placebokontrollert studie som undersøkte den kliniske effekten av olaparib pluss bevacizumab som en førstelinje vedlikeholdsbehandling for pasienter med avansert eggstokkreft. Pasientenes HRD-status ble bestemt etter randomisering før den primære analysen ved hjelp av CTA. Det primære endepunktet var progresjonsfri overlevelse (PFS), definert som tiden fra randomisering til progresjon bestemt av utprøvers vurdering ved bruk av modifisert RECIST 1.1 eller død. Av de 806 pasientene som ble randomisert i PAOLA-1-studien, var 399 gjenværende prøver tilgjengelige for testing med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Demografiske opplysninger om forsøkspersoner med tilgjengelige TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater var tilsvarende de som var i PAOLA-1-studien. På samme måte var deltakerkarakteristikker generelt like mellom de som var HRD-positive med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kontra de som var HRD-positive med CTA.

Konkordansresultater

Av de 399 prøvene som var tilgjengelige for testing med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), ga 382 et evaluerbart resultat. De 17 ikke-evaluerbare prøvene ga ikke et resultat på grunn av feil i hverken testkvalitetskontroll (N=12) eller patologigjennomgang (N=5) (analysens ugyldighetsrate på 3 % [12/394]). Totalt 365 innmeldte pasienter hadde prøver med både evaluerbar CTA og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater. Samsvar av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultater i forhold til CTA-resultater blant prøver med gyldige resultater vises i [Tabell 55](#).

Tabell 55 Konkordans mellom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) og CTA for deteksjon av HRD

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

* CI basert på nøyaktig binomial metode (Clopper-Pearson, 1934).

Resultater for klinisk effektivitet

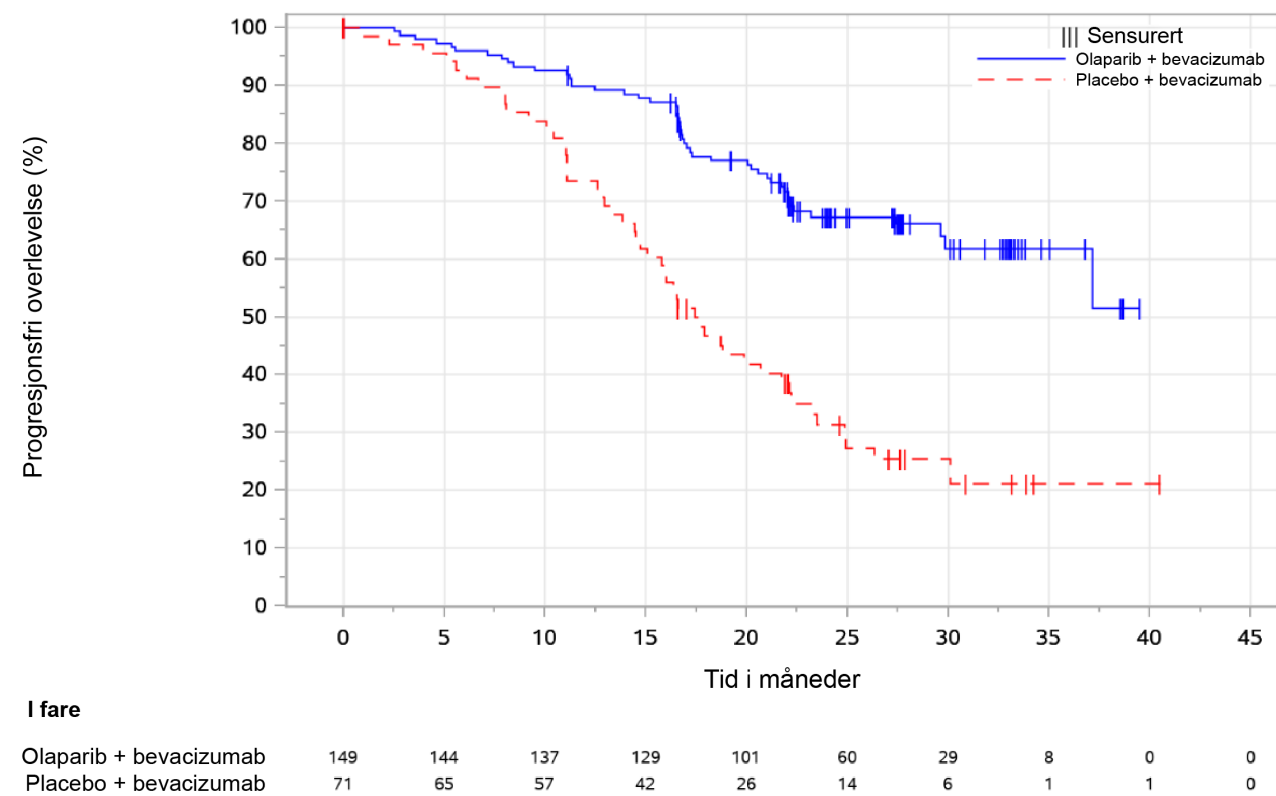
Den kliniske ytelsen til TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) ble etablert ved bestemmelse av klinisk effekt i den HRD-positive populasjonen. PFS-fareforhold (HR) for behandlingsgruppene olaparib kontra placebo ble beregnet ved hjelp av en ujustert Cox proporsjonal faremodell. [Tabell 56](#) viser PFS-fareforhold hos de CTA- og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positive deltakerne. [Figur 4](#) viser Kaplan-Meier-kurvene for PFS hos TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-positive deltakere. I CTA- og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positive populasjoner var PFS-fareforholdet henholdsvis 0,33 (95 % KI: 0,25, 0,45) og 0,32 (95 % KI: 0,22, 0,48), og representerte en 67 % og 68 % reduksjon i risikoen for progresjon eller død for deltakere i olaparib pluss bevacizumab-gruppen sammenlignet med placebo pluss bevacizumab-gruppen. En sensitivitetsanalyse som adresserte effekten av imputerte manglende CDx-resultater, viste at PFS-fareforholdene i de imputerte HRD-positive populasjonene var i samsvar med de primære analyseestimatene.

Tabell 56 Klinisk effekt i CTA og TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen

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

¹ PFS-median i måneder.
² Fra produktgrenset metode (Kaplan-Meier) for sensurerte data.
³ Basert på ustratifisert Cox-regresjonsmodell med behandling som kovariat.
⁴ NR = Ikke nådd

Figur 4 Kaplan-Meier-urve – PFS hos HRD-positive deltakere identifisert av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



Referanser

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. Informasjon om foreskriving av Lynparza (Olaparib). *U.S. Food and Drug Administration* (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208558s013lbl.pdf). Publisert 2014. Oppdatert oktober 2023. Åpnet 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

Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200080934 v00	Mai 2026	Første versjon.

Patenter og varemerker

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

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

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

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

© 2026 Illumina, Inc. Alle rettigheter forbeholdt.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. For spesifikk informasjon om varemerker, se www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformasjon



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

CE
2797



EC REP



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

Produktmerking

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

Du finner et sammendrag over sikkerhet og ytelse (SSP) på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, etter oppstart av Eudamed (Europeisk database over medisinsk utstyr). Det er knyttet til grunnleggende UDI-DI (0081627002TSOHRDDGRK).