

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)

(EU) Bipacksedel

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK. ENDAST FÖR EXPORT.

Avsedd användning

TruSight™ Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt test som använder riktad nästa generations sekvensering för att möjliggöra bedömning av Homologous Recombination Deficiency (HRD) med DNA extraherat från formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) tumörvävnadsprover från äggstockscancerpatienter med Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrumentet. Testet kan användas för att detektera enkla nukleotidvarianter, insertioner, deletioner och stora omstruktureringar i BRCA1- och BRCA2-gener och rapportera en genomisk instabilitetspoäng (GIS).

Testet är avsett att användas som en produkt för behandlingsvägledande diagnostik som används för att identifiera cancerpatienter som kan dra nytta av den riktade behandlingen som listas i [Tabell 1](#) i enlighet med den godkända terapeutiska produktmärkningen.

Tabell 1 Indikation för produkter för behandlingsvägledande diagnostik

Tumör typ	Biomarkör(er) detekterade	Behandling
Äggstockscancer, inklusive epitelial äggstockscancer, äggledarcancer och primär peritonealcancer	Homolog rekombinationsbrist (HRD) (definierad som skadliga eller misstänkta skadliga mutationer i BRCA1- och BRCA2-gener och/eller positiv genomisk instabilitetspoäng)	LYNPARZA® (olaparib)

Sammanfattning och förklaring av analysen

Klinisk beskrivning

Äggstockscancer har den högsta mortaliteten bland gynekologiska maligniteter.¹ Äggstockscancer omfattar epitelial äggstockscancer, äggledarcancer och primär peritonealcancer, vilka alla delar ett gemensamt biologiskt ursprung och betraktas tillsammans i terapeutiskt syfte.^{2,3} Cirka hälften av patienterna med höggradig serös och endometrioid äggstockscancer, vilka utgör relevanta histologiska underkategorier för bedömning, uppvisar genomiska defekter i den homologa rekombinationsreparationsvägen som leder till HRD.⁴ Förekomst av HRD är associerad med känslighet för platinabaserad kemoterapi⁵ och kliniskt svar på poly (adenosindifosfat [ADP]-ribos)-polymerashämmare (PARP-hämmare; PARPi), en klass av riktade behandlingar för äggstockscancer,⁶⁻¹² vilket resulterar i förbättrad progressionsfri och total överlevnad.^{5,13,14} I enlighet med resultaten från banbrytande kliniska studier^{6,7,12,15} kan behandlingsberättigande för PARPi vid äggstockscancer baseras på HRD-positiv status.¹⁶ PAOLA-1 var en multicenter-, fas III-, randomiserad, dubbelblindad och placebokontrollerad studie som undersökte den kliniska effekten av olaparib i kombination med bevacizumab

som förstahands underhållsbehandling för patienter med avancerad äggstockscancer.¹² TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) HRD (DRAGEN)-analysen validerades med hjälp av prover från patienter inkluderade i den kliniska PAOLA-1-studien.

Bland olika underliggande mekanismer som försämrar den homologa rekombinationsreparationsvägen är de mest karakteristiska mutationer av könsceller och somatisk funktionsförlust i BRC1A- och BRCA2-gener.^{4,13,17} Tester som utvärderar genomisk instabilitet (t.ex. substitutioner, deletioner, kopietalsförändringar och strukturella omstruktureringar) bedömer förekomsten av ett genomiskt ärr eller en mutationssignatur som indikerar HRD, oavsett underliggande orsak. GIS är ett mått på genomisk instabilitet som kombinerar information om storskaliga tillståndsovergångar (LST), förlust av heterozygositet (LOH) och telomerisk-allelisk obalans (TAI). Tillgängliga data från kliniska prövningar stöder den kliniska giltigheten av GIS som en biomarkör som identifierar BRCA-patienter med äggstockscancer av vildtyp vilka får betydande fördelar av PARPi-behandling.^{7,9,12,18}

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) är ett kvalitativt nästa generations sekvenseringstest (NGS) för behandlingsvägledande diagnostik (CDx) som rapporterar HRD-status hos äggstockscancerpatienter genom att detektera små DNA-varianter och deletioner på exonnivå (kallas för stora omstruktureringar [LR]) i BRCA1- och BRCA2-generna, i kombination med att bedöma GIS i förhållande till ett gränsvärde på 42.

För en lista över regioner i generna BRCA1 och BRCA2 som exkluderas från variantanalys, se dokumentationen som finns *TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) svartlista (dokumentnr 200066147)* tillgänglig på Illumina [supportsidan](#).

Grundläggande principer

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen är ett distribuerat test som utförs manuellt med extraherad nukleinsyra som material. DNA extraherat från FFPE-vävnad används för att bereda bibliotek som sedan anrikas för HRD-relaterade gener och sekvenseras på NextSeq 550Dx-instrument.

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen omfattar följande processer.

- **Biblioteksberedning och anrikning**—Från FFPE-vävnad fragmenteras 40 ng genomiskt DNA (gDNA) till små fragment. Universella adaptrar för sekvensering ligeras till gDNA-fragment. P5- och P7-adaptersekvenser integreras i varje bibliotek för att möjliggöra att biblioteksfragment fångas på ytan av flödescellen under sekvensering. Adaptrarna inkluderar i5- och i7-indexsekvenser för att identifiera varje individuellt prov och individuella molekyler med användning av unika moleky-ID (UMI). Biblioteken anrikas sedan för de specifika generna av intresse med hjälp av en fångstbaserad metod. Biotinylerade probsekvenser som omfattar analysens riktade genregioner av intresse hybridiseras till biblioteken. Proberna och de hybridiserade målbiblioteken isoleras från icke-riktade bibliotek genom fångst med magnetiska streptavidinpartiklar. De anrikade riktade biblioteken tvättas och amplifieras. Därefter normaliseras antalet i varje anrikat bibliotek med en kulbaserad metod för att säkerställa likvärdig representation i de poolade biblioteken för sekvensering.
- **Sekvensering och primär analys** – Normaliserade, anrikade bibliotek samlas i kluster på en flödescell och sekvenseras därefter med hjälp av SBS-kemi (sekvensering genom syntes) på NextSeq 550Dx. I SBS-kemi används en metod med reversibel terminator för att detektera enskilda, fluorescensmärkta dNTP-baser

(deoxynukleosidtrifosfat) medan de inkorporeras i växande DNA-strängar. En dNTP läggs till i nukleinsyrekedjan under varje sekvenseringscykel. dNTP-märkningen fungerar som en terminator för polymerisering. Efter varje dNTP-inkorporerande används det fluorescerande färgämnet för att identifiera basen och färgämnet klyvs sedan för att möjliggöra inkorporerande av nästa nukleotid. Fyra reversibla terminator-bundna dNTP:er (A, G, T och C) förekommer som enskilda, separata molekyler. Som ett resultat minimeras inkorporeringsbiasen av naturlig konkurrens. Under den primära analysen görs basbestämningar direkt utifrån signalintensitetsmätningar under varje sekvenseringscykel, vilket resulterar i sekvensering bas för bas. Ett kvalitetsresultat tilldelas till varje basbestämning.

- **Sekundär analys** – Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) finns på DRAGEN-server som en del av NextSeq 550Dx-instrument för att underlätta TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-körningskonfigurationen och utföra den sekundära analysen av sekvenseringsresultaten. Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) utför analyser av körningsbearbetning och kvalitetskontroll, följt av demultiplexering, FASTQ-filgenerering, linjering och variantbestämning. Vid demultiplexering separeras data från poolade bibliotek baserat på de unika sekvensindex som lades till under biblioteksberedningen. Programvaran genererar mellanliggande FASTQ-filer, som innehåller sekvenseringsläsningar med kvalitetsvärden för varje prov, exklusive läsningar från kluster som inte passerat filter. Sekvenseringsavläsningarna linjeras sedan mot ett referensgenom för att identifiera ett förhållande mellan sekvenserna och tilldelas ett resultat baserat på liknande regioner. Linjerade avläsningar skrivs till filer i BAM-format. Analysprogramvaran använder separata algoritmer för att detektera små DNA-varianter i BRCA1 och BRCA2, stora omstruktureringar i BRCA1 och BRCA2, samt GIS. Analysmodulernas programvara genererar flera typer av utdata, inklusive sekvenseringsmått och VCF-filer (Variant Call Format). VCF-filer innehåller information om varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom. Sekvenseringsmått och individuella utdatafiler genereras för varje prov.
- **Tertiära analyser** – Tertiära analyser som utförs av Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) består av CDx-bestämning och generering av resultatrapporter. De tolkade variantresultaten sammanfattas i TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultatrapporten. Se *Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN), arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)* för mer information om sekundär- och tertiäranalys.

Begränsningar

Endast för *in vitro*-diagnostiskt bruk.

- Endast på ordination. Testet måste beställas av kvalificerad medicinsk personal i enlighet med kliniska laboratoriebestämmelser.
- Beslut om patientvård och -behandling måste baseras på den behandlande läkarens oberoende medicinska bedömning, med hänsyn till all tillämplig information om patientens tillstånd, som patient- och familjehistorik, fysiska undersökningar, information från andra diagnostiska tester och patientens önskemål, i enlighet med vårdstandarden i ett visst samhälle.
- Kvaliteten på FFPE-prover varierar mycket. Kvaliteten kan påverkas enligt följande.

- Prover som inte genomgick standardfixeringsförfaranden kanske inte genererar extraherade nukleinsyror som uppfyller analysens kvalitetskontrollkrav (*Kvalitetskontroll på sidan 66*).
- Somatiska drivande mutationer kan inte detekteras tillförlitligt om tumörinnehållet (efter område) är mindre än 20 %.
- GIS kanske inte är tillförlitligt om tumörinnehållet (efter område) är mindre än 33 %.
- Prestanda för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) i prover som erhållits från patienter som har genomgått en organ- eller vävnadstransplantation har inte utvärderats.
- Kontamineringsdetektering kan påverkas enligt följande.
 - I starkt omarrangerade genom med deletioner och heterozygotförlust kan TSO Comprehensive (EU, DRAGEN)-programvaran felaktigt klassificera ett DNA-prov som kontaminerat (CONTAMINATION_SCORE > 1457).
 - Kontamination under proceduren kan bero på nukleinsyra från tidigare provbearbetningssteg. God laboratoriesed och att följa alla försiktighetsåtgärder och riktlinjer i denna bipacksedel hjälper till att undvika korskontaminering mellan prover.
- Ett negativt resultat utesluter inte närvaron av en mutation under analysens detektionsgräns (LoD). Förändringar vid allelfrekvenser under den fastställda LoD kan inte detekteras konsekvent.
- Sensitiviteten för detektion av små DNA-varianter kan påverkas av:
 - Genomiskt sammanhang med låg komplexitet.
 - Ökande variantlängd.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) har validerats för att detektera BRCA-insertioner och deletioner upp till 19 bp i längd och stora BRCA-omstruktureringar som är exonnivå eller högre. Varianter som är längre än 19 bp och ändringar och händelser som är subexoniska kanske inte detekteras av analysen, men kan påverka HRD-status. Lämplig klinisk-patologisk och laboriemässig korrelation rekommenderas.
- Deletioner på exonnivå är de enda stora omstruktureringar som rapporteras av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Insertioner på exonnivå rapporteras inte av analysen.

Produktkomponenter

Testet TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) består av följande komponenter:

- TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN)-sats (Illumina katalognummer 20140799)—Satsen inkluderar reagens med tillräcklig volym för att generera 24 DNA-bibliotek. Denna volym inkluderar patientprover och kontroller. Satsen innehåller probuppsättningen som används för att detektera BRCA-mutationer. Kontroller säljs separat (se [Nödvändiga reagenser som inte tillhandahålls på sidan 14](#)).



FÖRSIKTIGHET

Reagenser för RNA-biblioteksberedning medföljer TSO Comprehensive (DRAGEN)-satsen men krävs inte för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

- TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN)-sats (Illumina katalognummer 20134650) – satsen inkluderar reagens med tillräcklig volym för att generera 24 DNA-biblioteksanrikningar. Denna volym inkluderar patientprover och kontroller. Satsen innehåller probuppsättningen som används för GIS-bestämning.
- Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN) (Illumina katalognr 20132935), som innehåller följande komponenter:
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Kravpaket
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Programvaruuppsättning
 - TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) USB-sats

En Illumina-servicerepresentant installerar lämplig version av Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) och kravpaketet på DRAGEN-server för NextSeq 550Dx-instrument. Information om analysmodulen finns i *Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN), arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)*.

Reagenser

Reagenser som tillhandahålls

Illumina tillhandahåller följande reagens.

TruSight Oncology Comprehensive (DRAGEN) sats (Illumina katalognr 20140799)

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), artikelnr 20031118

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
End repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller T4 DNA-polymeras och polynukleotidkinas	-25 °C till -15 °C
End repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och nukleotider	-25 °C till -15 °C
Adaption Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller ligas	-25 °C till -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)*	20031439	1	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider för universell sekvensering	-25 °C till -15 °C
UMI adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider för universell sekvensering	-25 °C till -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller DNA-polymeras och nukleotider	-25 °C till -15 °C

* Reagens tillhandahålls men krävs inte för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), artikelnr 20031119

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vattenbaserad lösning som innehåller magnetkulor	2 °C till 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-lösning	2 °C till 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, artikelnr 20031120

Aktiva ingredienser: Buffrad vattenbaserad lösning innehållande individuellt streckkodade oligonukleotidprimrar.



FÖRSIKTIGHET

Kombinera inte CPxx- och UPxx-indexprimrar i samma bibliotek.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, artikelnr 20031126

Aktiva ingredienser: Buffrad vattenbaserad lösning innehållande individuellt streckkodade oligonukleotidprimrar.



FÖRSIKTIGHET

Kombinera inte CPxx- och UPxx-indexprimrar i samma bibliotek.

Indexprimer	Artikelnummer	Antal	Volym	i7-index	Sekvens	i5-index	Sekvens	Förvaringstemperatur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C till -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C till -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C till -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C till -15 °C

Indexprimer	Artikelnummer	Antal	Volym	i7-index	Sekvens	i5-index	Sekvens	Förvaringstemperatur
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C till -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C till -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C till -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C till -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C till -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C till -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C till -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C till -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C till -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C till -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C till -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), artikelnr 20031123

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller formamid och salter	2 °C till 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och paramagnetiska kulor i fast fas kovalent belagda med streptavidin	2 °C till 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxidlösning	2 °C till 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning	2 °C till 8 °C
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller paramagnetiska kulor i fast fas	2 °C till 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkaptoetanol och formamid	2 °C till 8 °C

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vattenbaserad lösning som innehåller magnetkulor	2 °C till 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), artikelnr 20031121

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider	-25 °C till -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel	-25 °C till -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller DNA-polymeras och nukleotider	-25 °C till -15 °C

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller P5- och P7-primrar	–25 °C till –15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkaptoetanol och formamid	–25 °C till –15 °C
PhiX (PX3 eller PhiX)	20031492	1	10 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller PhiX genomiskt DNA	–25 °C till –15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, artikelnr 20031122

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)*	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidprobpool	–25 °C till –15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidprobpool	–25 °C till –15 °C

* Reagens tillhandahålls men krävs inte för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, artikelnr 20031127

Följande reagenser tillhandahålls men krävs inte för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och nukleotider	–25 °C till –15 °C

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, DNA-polymeras, RNas H och nukleotider	-25 °C till -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och slumpmässiga hexamerer	-25 °C till -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller reverse transcriptase	-25 °C till -15 °C

TruSight Oncology Comprehensive HRD (DRAGEN) sats (Illumina katalognr 20134650)

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate), artikelnr 20140116

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	1	870 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller formamid och salter	2 °C till 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	1	7,78 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och paramagnetiska kulor i fast fas kovalent belagda med streptavidin	2 °C till 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	1	400 µl	Natriumhydroxidlösning	2 °C till 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	1	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning	2 °C till 8 °C

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Library Normalization Beads (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller paramagnetiska kulor i fast fas	2 °C till 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	1	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkaptoetanol och formamid	2 °C till 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	1	3,5 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2 °C till 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	1	6,11 ml	Vattenbaserad lösning som innehåller magnetkulor	2 °C till 8 °C

TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze), artikelnr 20140115

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	1	521 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller oligonukleotider	-25 °C till -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	-25 °C till -15 °C
Enrichment Solution 2 (EE2)	20031488	2	1,65 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel	-25 °C till -15 °C

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	1	550 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller DNA-polymeras och nukleotider	–25 °C till –15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	1	150 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller P5- och P7-primrar	–25 °C till –15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-Merkaptoetanol och formamid	–25 °C till –15 °C

TruSight Oncology Comp HRD Content Set, artikelnr 20140117

Reagens	Artikelnummer	Antal	Volym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Oncology DNA Probe Pool 3 (OPD3)	20082795	1	290 µl	Oligonukleotidprobpool	–25 °C till –15 °C

Nödvändiga reagenser som inte tillhandahålls

Pre-amplifieringsreagenser

- Reagenser för DNA-extraktion och DNA-rening – Se [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 22](#) för reagenskrav.
- DNA-kvantifieringsreagens – Se [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 22](#) för reagenskrav.
- TruSight Oncology Controls:
 - TruSight Oncology DNA Control v2 (Illumina-katalognr 20090155)
- Etanol (EtOH), 100-procentig (200 proof) för molekylärbiologisk användning
- RNas/DNas-fritt vatten

Post-amplifieringsreagenser

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) (Illumina katalognr 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cykler)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykler)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cykler)
- EtOH, 100-procentig (200 proof) för molekylärbioologisk användning
- RNas/DNas-fritt vatten

Förvaring och hantering av reagenser

Följande reagensförpackningar skickas frysta. Förvara vid –25 °C till –15 °C.

Förpackning	Artikelnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post-amplifiering
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplifiering
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze)	20140115	Post-amplifiering
TruSight Oncology Comp HRD Content Set	20140117	Post-amplifiering

Följande reagensförpackningar skickas på geldynor för att upprätthålla en temperatur på 0 °C till 10 °C. Förvara vid 2 °C till 8 °C.

Förpackning	Artikelnummer	Laboratorieområde
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pre-amplifiering
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post-amplifiering
TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate)	20140116	Post-amplifiering



FÖRSIKTIGHET

Förvara inte reagenser i en frostfri behållare eller i kylskåpsdörrar.



FÖRSIKTIGHET

Frys inte reagenser som innehåller kulor (LNB1, SPB och SMB).

- Förändringar av reagensernas utseende kan indikera en försämring av materialens kvalitet. Använd inte reagenserna om förändringar av deras utseende observeras (till exempel förändringar av reagensens färg eller grumlighet).
- ERA1-B och TCB1 kan ha produktrelaterade partiklar. Följ de specifika hanteringsriktlinjerna för varje reagens.
- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens stabilitet har utvärderats och prestanda för upp till fyra användningar av satsen har bekräftats. Reagenserna är stabila när de förvaras enligt de angivna temperaturerna fram till det specifika utgångsdatumet som anges på förpackningen.

Utrustning och material

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Utrustning och material för pre-amplifiering

Utrustning	Tillverkare
Ultrasonikator med tillhörande tillbehör Se Konfigurationsinställningar för ultrasonikator för DNA-fragmentering på sidan 20 .	Valfri leverantör av laborieutrustning
Vortexblandare	Valfri leverantör av laborieutrustning
Mikroprovsinkubatorer (2) med insatser för MIDI-plattor med 96 brunnar (2)	Valfri leverantör av laborieutrustning
Mikrocentrifug	Valfri leverantör av laborieutrustning
Plattcentrifug med följande specifikationer: - Kompatibel med mikroplattor med 96 brunnar - Kapacitet för 280 x g (+/- 10 %)	Valfri leverantör av laborieutrustning
Plattskakare med följande specifikationer: - Omloppsbana på 2 mm - Kan skaka vid 1 200 och 1 800 rpm	Valfri leverantör av laborieutrustning
Förseglingsrulle eller -kil	Valfri leverantör av laborieutrustning
Magnetiskt stativ med följande specifikationer: - Utformat för precipitation/separation av paramagnetiska kulor - Magneter på sidan av stativet (inte nedtill) - Kompatibel med MIDI-plattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laborieutrustning

Utrustning	Tillverkare
Precisionspipetter som exakt kan leverera volymer mellan 2 µl och 1 000 µl med följande specifikationer: • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,02 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 1 µl eller 2 µl Pipetterna måste kalibreras regelbundet och ha en exakthet som ligger inom 5 % av angiven volym.	Valfri leverantör av laborieutrustning
Pipettstöd	Valfri leverantör av laborieutrustning
Is- eller kylblock	Valfri leverantör av laborieutrustning
Serologiska pipetter, 10 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning
Självhäftande förseglingar för plattor med 96 brunnar med följande specifikationer: • Avdragbar • Passar PCR-plattor med krage och halv krage • Starkt häftämne som motstår flera temperaturförändringar inom intervallet -20 °C till 100 °C • DNAs-/RNAs-fria	Valfri leverantör av laborieutrustning
Mikrocentrifugrör med kapacitet på 1,7 ml, nukleasfria	Valfri leverantör av laborieutrustning
Nukleasfria reagensbehållare (engångstråg, 50 ml) (eller motsvarande)	Valfri leverantör av laborieutrustning
Koniska rör, 15 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning
Koniska rör, 50 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning
Kompatibla aerosolresistenta pipettspetsar	Valfri leverantör av laborieutrustning
Förvaringsplattor för 96 brunnar, 0,8 ml (MIDI-plattor)	Fisher Scientific, artikelnr AB-0859 eller motsvarande
PCR-plattor med 96 brunnar, kompatibla med termocykler, 0,2 ml (brunnar av polypropylen)	Valfri leverantör av laborieutrustning

Utrustning och material för post-amplifiering

Utrustning	Tillverkare
NextSeq 550Dx instrument	Illumina, katalognr 20005715
Plattcentrifug med följande specifikationer: • Kompatibel med mikroplattor med 96 brunnar • Kapacitet för 280 x g (+/- 10 %)	Valfri leverantör av laborieutrustning
En termocykler med följande specifikationer: • Uppvärm lock (100 °C) • Omfattar ett temperaturintervall på 4 °C till 99 °C • Temperaturnoggrannhet på ±0,25 °C • Kompatibel med PCR-plattor med 96 brunnar, 0,2 ml • Se Ramphastighet för termocykler på sidan 21	Valfri leverantör av laborieutrustning
Vortexblandare	Valfri leverantör av laborieutrustning
Mikroprovsinkubator med en insats för MIDI-plattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laborieutrustning
Värmeblock med följande specifikationer: • Temperaturintervall från 25 °C till 99 °C • Temperaturnoggrannhet på ±5 °C • Se till att mikrocentrifugrören är kompatibla med värmeblocket	Valfri leverantör av laborieutrustning
Plattskakare med följande specifikationer: • Omloppsbanan på 2 mm • Kan skaka vid 1 200 och 1 800 rpm	Valfri leverantör av laborieutrustning
Mikrocentrifug	Valfri leverantör av laborieutrustning
Förseglingsrulle eller -kil	Valfri leverantör av laborieutrustning
Magnetiskt stativ med följande specifikationer: • Utformat för precipitation/separation av paramagnetiska kulor • Magneter på sidan av stativet (inte nedtill) • Kompatibel med MIDI-plattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laborieutrustning

Utrustning	Tillverkare
Precisionspipetter som exakt kan leverera volymer mellan 2 µl och 1 000 µl med följande specifikationer: • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,02 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 0,1 µl, 0,2 µl eller 0,5 µl • En- eller flerkanaliga pipetter med steg om 1 µl eller 2 µl Pipetterna måste kalibreras regelbundet och ha en exakthet som ligger inom 5 % av angiven volym.	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Pipettstöd	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Serologiska pipetter, 10 ml	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Självhäftande förseglingar för plattor med 96 brunnar med följande specifikationer: • Avdragbar • Passar PCR-plattor med krage och halv krage • Starkt häftämne som motstår flera temperaturförändringar inom intervallet -20 °C till 100 °C • DNas-/RNas-fria	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Mikrocentrifugrör med kapacitet på 2 ml, nukleasfria	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Mikrocentrifugrör med kapacitet på 1,7 ml, nukleasfria	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Nukleasfria reagensbehållare (engångstråg, 50 ml) (eller motsvarande)	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Koniska rör, 15 ml	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Koniska rör, 50 ml	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Kompatibla aerosolresistenta pipettspetsar	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Förvaringsplattor för 96 brunnar, 0,8 ml (MIDI-plattor)	Fisher Scientific, artikelnr AB-0859 eller motsvarande
PCR-plattor med 96 brunnar, kompatibla med termocykler, 0,2 ml (brunnar av polypropylen)	Valfri leverantör av laborarieutrustning
Is- eller kylblock	Valfri leverantör av laborarieutrustning

Konfigurationsinställningar för ultrasonikator för DNA-fragmentering

DNA-fragmentering, eller -klippning, påverkar analysprestandan genom att bestämma fördelningen av fragmentstorlek, vilket i sin tur påverkar sekvenseringstäckningen. Flera fokuserade ultrasonikeringskonfigurationer utvärderades och optimerades för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen ([Tabell 2](#)).

- Klippningstiden justerades för att maximera måttet MEDIAN_EXON_COVERAGE som beskrivs i avsnittet [Kvalitetskontroll på sidan 66](#). Klippningstider (se [Tabell 2](#)) och MEDIAN_INSERT_SIZE skilde sig åt mellan konfigurationer.
- Konfigurationerna 1–4 och 6 testades med glaströr med åtta remsor. Konfiguration 5 använde ett enda glaströr. Rörens volymkapacitet visas i [Tabell 2](#).
- Optimering av konfigurationerna 3–6 (mindre vattenbadsvolymer) använde pulsering.
- Konfigurationerna 3–5 klipptes i mindre volymrör. Rörens volymkapacitet påverkar klippningsparametrarna.
- Konfiguration 4 (ledningsgivare, medelstor vattenbadsvolym, avgasat vatten) krävde en lång pulsfördröjningstid (40 sekunder) för att uppnå liknande MEDIAN_EXON_COVERAGE som konfiguration 1 och 2 vid nominell inmatning på 40 ng.
- Optimala inställningar för konfiguration 3 resulterade i en något större fragmentstorleksfördelning jämfört med de andra konfigurationerna (MEDIAN_INSERT_SIZE var ungefär 5–10 baspar större).
- Konfiguration 3 och 5 använde icke-avgasat vatten och den minsta vattenbadsvolymen.
- Konfiguration 3 och 5 behövde ökad DNA-inmatning (50 ng för konfiguration 3, 60 ng för konfiguration 5) för att uppnå liknande MEDIAN_EXON_COVERAGE i förhållande till de övriga fyra konfigurationerna, som använde den nominella inmatningen på 40 ng.
- Konfigurationerna 3 och 5 har mer skada och/eller denaturering och därför en reducerad effektiv massa av användbara dsDNA-molekyler för biblioteksberedning.

Centrifugera klippningsrören under återhämtningsprocessen för att säkerställa att den specificerade volymen återhämtas, eftersom eventuell förlust av material kan påverka prestandan negativt.

Tabell 2 Utvärderade konfigurationer för fokuserade ultrasonikatorer

Parameter	Konfiguration					
	1	2	3	4	5	6
Givare	Linje	Punkt	Punkt	Linje	Punkt	Linje
Vattenbadsvolym	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Avgasat vatten	Ja	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
Vattenkylare	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Vattenbadstemperatur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Peak Incident Power (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Arbetskvot i %	30	10	30	25	20	25
Cykler per skur	200	200	1 000	1 000	1 000	600 ⁵
Pulserande (10 sekunders skurar)	Nej	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Fördröjningstid för pulserande	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	10 s	40 s	10 s	10 s
Klippningstid	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Provbearbetning	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Batchstorlek	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Provstorlek för provrörsremsa med åtta rör i glas	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Enkelrör (50 µl)	130 µl (eller 96 microTUBE Plate)
Tveksamhet	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt	3 mm Y vid 20 mm/s	Ej tillämpligt	1,5 mm Y vid 10 mm/s
Motsvarande DNA-inmatning (för medianexontäckning)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Klippningstiden på 200 sekunder består av skurar på 10 sekunder med 20 repetitioner.

² Klippningstiden på 320 sekunder består av skurar på 10 sekunder med 32 repetitioner.

Ramphastighet för termocykler

Optimering av termocyklerns ramphastighet rekommenderas. Till exempel justerades en testad modell från en standard (och maximal) ramphastighet på 5 °C/s till 3 °C/s för att få jämförbara resultat till andra modeller med lägre standardramphastigheter.

Insamling, transport och förvaring av prover

Följ standardförfaranden vid insamling, transport, förvaring och bearbetning av prover.

Provkrav

FFPE-vävnad

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen kräver 40 ng DNA extraherat från äggstocks-, äggledar- eller primär peritoneal FFPE-vävnad. Vävnaden ska fixeras med hjälp av formalinfixativ som är lämpat för molekylära analyser (till exempel 10 % neutralbuffrat formalin). Vävnaden får inte dekalCIFieras. Vävnadsprovet ska undersökas av en patolog för att säkerställa att det är lämpligt för det här testet innan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen utförs. Minst 20 % tumörinnehåll (efter område) krävs för att detektera somatiska drivande mutationer. Minst 33 % tumörinnehåll (efter område) krävs för att detektera GIS.

För en hög sannolikhet att extrahera 40 ng DNA är den rekommenderade vävnadsvolymen $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Denna volym motsvarar ett kumulativt viabelt vävnadsområde på $\geq 200 \text{ mm}^2$ med 5 μm tjocka sektioner eller $\geq 100 \text{ mm}^2$ med 10 μm tjocka sektioner. Det kumulativa vävnadsområdet är summan av det viabla vävnadsområdet i alla sektioner som ska extraheras. Till exempel kan ett kumulativt vävnadsområde på 200 mm^2 erhållas genom att extrahera fyra 5 μm sektioner med 50 mm^2 vävnadsområde vardera eller fem 10 μm sektioner med 20 mm^2 vävnadsområde vardera. Vävnadsnekros kan minska utbytet av nukleinsyror. För att minimera risken för falskt negativa resultat kan vävnaden makrodissekeras för att avlägsna nekrotisk vävnad och uppnå en önskvärd andel viabel tumörvävnad.

FFPE-vävnad som fästs på objektglas kan förvaras i upp till 28 dagar vid rumstemperatur.

Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra

- Extrahera DNA från FFPE-vävnadsprover med hjälp av kommersiellt tillgängliga extraheringssatser. Skillnader i extraktionssatser kan påverka prestandan. Se [Utvärdering av extraktionssatser för nukleinsyra på sidan 86](#).
- Förvara extraherad nukleinsyra i enlighet med anvisningarna från tillverkaren av extraktionssatsen.
- Förvara extraherat DNA i upp till 28 dagar vid $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Mät DNA inom 28 dagar från det att biblioteksberedning påbörjas för att undvika att koncentrationen förändras över tid. Kvantifiera DNA med en fluorometrisk kvantifieringsmetod som använder nukleinsyrebindande färgämnen. Koncentrationen av nukleinsyra ska vara medelvärde av minst tre mätningar.
- Analysen kräver 40 ng av varje gDNA-prov med en minsta extraktionskoncentration på $3,33 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Klippning kräver en slutlig volym på $52 \mu\text{l}$ ($0,77 \text{ ng}/\mu\text{l}$) med minst $40 \mu\text{l}$ TEB (tillhandahålls) som spädningsmedel.

Biblioteksförvaring

Du kan förvara bibliotek på PCR-plattor med låg bindning i sju till 32 dagar, beroende på typen av bibliotek (se [Tabell 3](#)).

Tabell 3 Förvaringstider för bibliotek

Bibliotekstyp	Platta	Antal dagar	Förvaringstemperatur
Fragmenterat gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C till -15 °C
Före anrikning	ALS PCR	≤ 30	-25 °C till -15 °C
Efter anrikning	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C till -15 °C
PCR efter anrikning	PL PCR	≤ 30	-25 °C till -15 °C
Normaliserad	NL PCR	≤ 32	-25 °C till -15 °C

Varningar och försiktighetsåtgärder

Säkerhet



VARNING

Denna uppsättning reagenser innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Ventilation ska vara lämplig för hantering av farliga material i reagenser. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS på support.illumina.com/sds.html.

- Vissa komponenter i denna analys innehåller formamid, en alifatisk amid som är cancerframkallande och ett troligt reproduktionstoxin. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och laboratorierock. Hantera och kassera använda reagenser som kemiskt avfall i enlighet med statliga säkerhetsstandarder för din region. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS genom att söka efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Reagenser som tillhandahålls på sidan 5](#) för mer information).
- Vissa komponenter i denna analys innehåller 2-merkaptoetanol, ett reduktionsmedel. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Använd på en väl ventilerad plats och släng tomma förpackningar och oanvänt innehåll i enlighet med lokala bestämmelser. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS genom att söka efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Reagenser som tillhandahålls på sidan 5](#) för mer information).

- Vissa komponenter i denna analys innehåller natriumhydroxid, en starkt frätande bas. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och laboratorierock. Hantera i enlighet med god laboratoriesed och kassera i enlighet med tillämpliga regionala, nationella och lokala lagar och förordningar. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS genom att söka efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Reagenser som tillhandahålls på sidan 5](#) för mer information).
- Vissa komponenter i detta test (EPM) innehåller tetrametylammoniumklorid, ett akut toxiskt ämne, ett hudirriterande ämne och ett vattenförorenande ämne. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och laboratorierock. Hantera i enlighet med god laboratoriesed och kassera i enlighet med tillämpliga regionala, nationella och lokala lagar och förordningar. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS genom att söka efter produktkoden på support.illumina.com/sds.html. (Se [Reagenser som tillhandahålls på sidan 5](#) för mer information).
- Hantera alla prover som smittsamma ämnen.
- Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierock vid hantering av prov och analysreagenser. Tvätta händer noga efter att du hanterat prov och analysreagenser.
- Rapportera omedelbart alla allvarliga händelser relaterade till den här produkten till Illumina och behöriga myndigheter i det land där användaren och patienten befinner sig.

Laboratorium

- Tillämpa ett arbetsflöde med en riktning i laboratoriet för att förhindra kontaminering. Pre-amplifieringsområden och post-amplifieringsområden måste ha egen utrustning och eget material (till exempel pipetter, pipettspetsar, vortexblandare och centrifug). Förhindra amplifieringsprodukt- eller proböverföring genom att undvika att gå tillbaka till pre-amplifieringsområdet efter att du har gått vidare till post-amplifieringsområdet.
- Utför stegen Index PCR och Anrikning i ett post-amplifieringsområde för att förhindra överföring av amplifieringsprodukt.
- Biblioteksberedningarna kräver en RNas-/DNas-fri miljö. Dekontaminera alla arbetsområden noggrant med ett RNas-/DNas-hämmande rengöringsmedel. Använd plast som är certifierad för att vara fri från DNAs, RNas och humant genomiskt DNA.
- För post-amplifieringsförfaranden ska du rengöra arbetsområden och utrustning noggrant med en nyblandad 0,5-procentig NaOCl-lösning (natriumhypoklorit) innan och efter varje förfarande. Lämna lösningen på ytor i 10 minuter och torka sedan noggrant rent med 70-procentig etanol eller isopropanol.
- Använd nukleasfria mikrocentrifugrör, plattor, pipettspetsar och behållare.
- Använd kalibrerad utrustning under hela analysen. Var noga med att kalibrera utrustningen efter de hastigheter, temperaturer och volymer som anges i det här protokollet.

- Använd precisionspipetter för att säkerställa korrekt reagens- och provöverföring. Kalibrera regelbundet i enlighet med tillverkarens specifikationer.
- Tillämpa följande riktlinjer när du använder pipetter med flera kanaler:
 - Pipettera minst $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Kontrollera att spetsarna sitter ordentligt och är lämpliga för pipettmärket och -modellen.
 - Fixera spetsarna med en rullande rörelse för att säkerställa att alla spetsar sitter lika bra.
 - Aspirera med en 90° vinkel och samma volymnivåer i alla spetsar.
 - Blanda alla komponenter efter leverans genom att pipettera reaktionsblandningen upp och ner.
 - Säkerställ att vätska har dispenserats fullständigt från varje spets efter dispensering.
- Var noga med att använda den utrustning som anges för analysen och att konfigurera program enligt anvisningarna.
- Angivna temperaturer för termocyklern och mikroprovsinkubatorn indikerar reaktionstemperaturer och inte nödvändigtvis utrustningens inställda temperatur.

Analys

- Undvik korskontaminering.
 - Följ god laboratoriesed vid hantering av prover och reagenser.
 - Byt till ny laboratorieutrustning för engångsbruk och nya pipettspetsar mellan prover och mellan dispensering av reagenser.
 - Använd aerosolresistenta spetsar för att minska risken för korskontaminering.
 - Tillämpa ett arbetsflöde med en riktning vid förflyttning från pre-amplifieringsområden till post-amplifieringsområden.
 - Hantera och öppna endast en indexprimer åt gången. Sätt omedelbart tillbaka locket på varje indexrör efter användning. Extra lock medföljer i satsen.
 - Byt handskar ofta och om de kommer i kontakt med indexprimrar eller prover.
 - Avlägsna oanvända indexprimerrör från arbetsområdet.
 - Överför inte reagenser tillbaka till satsrör efter att de har använts med en rörremsa, ett tråg eller en behållare.
 - Blanda prover med en pipett och centrifugera plattan när det anges.
 - Använd en skakapparat för mikroplattor. Vortexblanda inte plattorna.
- Byt inte ut analyskomponenter från olika loter med reagenssatser. Information om vilken lot en reagenssats tillhör finns på märkningen på reagenssatsens förpackning och masteranalysblad.
- God laboratoriesed krävs för att förhindra att nukleaser och PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument, prover och bibliotek. Kontaminering från nukleaser och PCR-produkter kan orsaka felaktiga och otillförlitliga resultat.

- Rätt platttyp krävs för optimal analysprestanda och förvaring. Var noga med att följa anvisningarna för plattöverföring i [Bruksanvisning på sidan 34](#).
- Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämra biblioteks kvaliteten.
- Om inget säkert stoppsteg anges i [Bruksanvisning på sidan 34](#), fortsätt omedelbart till nästa steg.
- Förvara analysreagenserna eller -komponenterna vid den angivna temperaturen i avsedda pre-amplifieringsområden och post-amplifieringsområden.
- Förvara inte reagenser i en frostfri behållare eller i kylskåpsdörrar.
- Frys inte reagenser som innehåller kulor (LNB1, SPB och SMB).
- Använd inte reagenser som har förvarats på ett felaktigt sätt.
- Avvik inte från blandnings- och hanteringsförfarandena som anges för varje reagens. Otillräcklig blandning eller övervortexblandning av reagenser kan resultera i misslyckade provresultat.
- ERA1-B och TCB1 kan ha produktrelaterade partiklar. Följ hanteringsriktlinjerna för varje specifikt reagens.
- Bered nya masterblandningar och kassera resterande volym efter användning.
- Bered alltid ny 80-procentig etanol med RNas/DNas-fritt vatten för tvättsteg. Etanol kan absorbera vatten från luften, vilket kan påverka resultaten. Kassera 80-procentig etanol efter användning i enlighet med lokala, nationella och/eller federala föreskrifter.
- Överför den angivna volymen eluat. Resultaten kan påverkas om du överför mindre än den angivna volymen eluat.
- Tillämpa följande riktlinjer för ultrasonikatorer. Var noga med att följa tillverkarens anvisningar.
 - Överför gDNA till ultrasonikatorröret långsamt för att undvika att bubblor skapas. Alltför många bubblor eller en luftficka i klippningsröret kan resultera i ofullständig fragmentering.
 - Dispensera långsamt i ultrasonikatorrör och undvik stänk.
 - Undvik att vätska flyttas eller att prover går förlorade genom att inte föra pipettspetsen till ultrasonikatorrörets botten vid avlägsnande av fragmenterat DNA.
- Pipettera inte mindre än 2 µl av provet.
- Använd inte ett tråg för att dispensera reagenser för steg som kräver att mindre än 10 µl material tillsätts till varje provbrunn.
- Använd en pipett med smal spets vid överföring av fragmenterade gDNA-prover från ultrasonikatorrören till LP-plattan (biblioteksberedning).
- Använd endast UMI-adaptrar.
- Använd inte SUA1-adaptrar.
- Tilldela olika indexprimrar till varje biblioteksprov för att kunna identifiera varje bibliotek när de poolas för sekvensering på en flödescell.
- UPxx-index eller CPxx-index kan användas.

- Kombinera inte CPxx- och UPxx-indexprimrar i samma bibliotek.
- Bristande överensstämmelse mellan proven och indexprimrarna leder till felaktig rapportering av resultat på grund av förlust av positiv providentifikation. Ange prov-ID:n och tilldela index i Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN) innan biblioteksberedningen inleds. Spara prov-ID:n, indexering och plattbrunnens riktning att använda som referens vid biblioteksberedning.
- Sekvensera max 16 DNA-bibliotek per flödescell. Sekvensera minst sex bibliotek. Följ riktlinjerna i [Antalet bibliotek och att välja index på sidan 31](#).
- Efter bindingssteget i [Fånga mål 1 på sidan 48](#) och [Fånga mål 2 på sidan 52](#) ska du omedelbart fortsätta till tvättningssteget för att förhindra att pelleten torkar.
- Avlägsna all 80-procentig etanol från botten av brunnarna under tvättsteg. Etanolrester kan påverka resultaten.
- Följ antalet tvättar som anges i [Bruksanvisning på sidan 34](#) för optimala analysprestanda.
- Återsuspendera library beads-pelleten noggrant under förfarandet [Normalisera bibliotek på sidan 58](#) för att uppnå konsekvent klusterdensitet på flödescellen.
- DNA-bibliotek från samma prov berikas med två olika probeuppsättningar men använder samma index och måste sekvenseras på samma flödescell.
- Positiva kontroller och kontroll utan mall (NTC) måste bearbetas som ett prov och delas för anrikning med båda probeuppsättningarna.

Metodanmärkningar

- TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbetsflödet kan utföras enligt följande schema:
 - Dag 1: DNA-fragmentering av gDNA-prover, biblioteksberedning och inled hybridisering över natten (den första).
 - Dag 2: Anrikning, normalisering av anrikade bibliotek och överföring av bibliotek till NextSeq 550Dx-instrument.

Om det inte är möjligt att utföra TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbetsflödet enligt det här schemat finns det flera säkra stoppunkter angivna i protokollet. Om ingen säker stoppunkt har specificerats i protokollet fortsätter du direkt till nästa steg.

- DNA-härledda bibliotek delas upp i separata brunnar för samtidig anrikning med OPD2-probeuppsättningen och OPD3-probeuppsättningen. Positiva kontroller och NTC:er måste följa samma förfarande.
- Använd TruSight Oncology Comp Enrichment components (artikelnr 20031123, artikelnr 20031121) med OPD2 från TruSight Oncology Comp Content Set (artikelnr 20031122). Bibliotek anrikade med OPD2 kallas DNA-bibliotek.
- Använd TruSight Oncology Comp HRD Enrichment components (artikelnr 20140116, artikelnr 20140115) med OPD3 från TruSight Oncology Comp HRD Content Set (artikelnr 20140117). Bibliotek anrikade med OPD3 kallas DNA HRD-bibliotek.

- Tabeller för beredning av masterblandning innefattar volymöverskott för att säkerställa att det finns tillräcklig volym för antalet prover som bearbetas.
- Använd vatten av molekylär kvalitet och som är fritt från nukleaser.
- Efter att reagens har tillsatts ska du skölja spetsen genom att aspirera och dispensera en gång i lämplig brunn på plattan, om inget annat anges i förfarandet.
- Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.
- Reagenser, prover och bibliotek måste förvaras kallt vid vissa steg i bruksanvisningen. Detta definieras som att förvaras på is eller motsvarande.

Termocyklerprogram

- Programmera termocyklerprogram på post-amplifieringsutrustning innan protokollet inleds.
- Kontrollera att PCR-plattorna sitter ordentligt i termocyklern.
- Använd plattor som tillverkaren av termocyklern rekommenderar.

Försegling av plattan och avlägsnande av försegling

- Försegla alltid plattor med en ny självhäftande plattförsegling. Återanvänd inte förseglingar.
- Försegla plattan genom att applicera det självhäftande omslaget på plattan med en förseglingsrulle eller -kil.
- Försegla alltid plattan med 96 brunnar med en ny självhäftande plattförsegling innan följande steg i protokollet:
 - Skakningssteg för platta
 - Centrifugeringssteg
 - Termocyklersteg
 - Hybridiseringar
 - Långtidsförvaring
- Kontrollera att kanterna och brunnarna är förseglade för att reducera risken för korskontaminering och avdunstning.
- Placera plattan på en plan yta innan du långsamt tar bort förseglingen.
- Om någon vätska eller kondens observeras på förseglingen eller plattbrunnarnas sidoväggar ska du centrifugera vid $280 \times g$ i en minut innan förseglingen bryts.
- Använd självhäftande plattförseglingar som är effektiva vid -20 °C till 100 °C och passar PCR-plattor med krage och halv krage.

Utrustning

- Säkerställ att laboratoriepersonalen är bekant med tillverkarens anvisningar för drift och underhåll av all utrustning innan analysen startas.

Platttyp och plattöverföring

- Rätt platttyp krävs för optimal analysprestanda och förvaring.
- Vid överföring av volymer mellan plattor ska du överföra den angivna volymen från varje brunn på en platta till motsvarande brunnar på målpattan.
- Pipetter med flera kanaler kan användas vid överföring av prover mellan rörremсор eller plattor.
- Tillämpa följande riktlinjer vid skakning av plattor.
 - Använd en plattskakare för att skaka plattor. Vortexblanda inte plattor.
 - Skaka PCR-plattor vid 1 200 rpm.
 - Skaka MIDI-plattor vid 1 800 rpm.
 - Följ tillverkarens anvisningar för att säkerställa att plattskakaren håller plattan ordentligt på plats.

Centrifugering

- När anvisningarna i protokollet instruerar att centrifugera kort ska du centrifugera vid $280 \times g$ i en minut.
- Centrifugera plattan vid $280 \times g$ i en minut om vätska observeras på förseglingen eller på en brunns sidor.

Hantering av reagenser

- Stäng alla reagensrör ordentligt omedelbart efter användning för att begränsa avdunstning och förhindra kontaminering.
- Placera reagenserna i den angivna förvaringstemperaturen igen när de inte längre behövs i ett förfarande.
- Följ reagensberedningen som kommer före varje förfarandedel i avsnittet i [Bruksanvisning på sidan 34](#).
- Var noga med att bereda rätt volym masterblandning, elueringsblandning och 80-procentig etanol för antalet prover som ska bearbetas.
- Volymerna som anges i tabellerna för masterblandning och lösningar innefattar överskott.
Överskottsvolymen beräknas enligt följande:
 - [Tabell 13](#)
 - Volym ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,20)$
 - Volym ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,20)$
 - [Tabell 23](#)
 - Volym EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
 - Volym HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
 - [Tabell 24](#)

- Volym EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
- Volym HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,364)$
- [Tabell 30](#)
 - Volym LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (2,0)$
 - Volym LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (2,0)$
- [Tabell 31](#)
 - Volym EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,25)$
 - Volym HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{antalet bibliotek}) \times (1,25)$

Adapteruppsättningar

- Använd endast UMI-adaptrar.
- SUA1-adaptrar tillhandahålls men krävs inte för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

Hantera klor

- Det ingår tre typer av klor i TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen (SPB, SMB och LNB1). Säkerställ att rätt typ av kula används under förfarandet.
- Utför rätt antal tvättar för varje typ av kula.
- Kontrollera att kulorna är rumstempererade innan användning.
- Blanda kulorna i en minut innan användning för att säkerställa homogenitet.
- Tillämpa följande riktlinjer vid blandning av klor med en pipett:
 - Använd en pipett och spetsstorlek som är lämplig för volymen som du blandar.
 - Justera volyminställningen till cirka 50–75 % av provvolymen.
 - Pipettera långsamt utan att släppa kolven.
 - Undvik stänk och att bubblor skapas.
 - Placera pipettspetsen ovanför pelleten och dispensera direkt på pelleten för att släppa kulorna från brunnen eller röret.
 - Kontrollera att pelleten är helt omgiven av lösning. Lösningen ska vara mörkbrun och ha en homogen konsistens.
 - Bedöm om det finns en kulpellet. Aspirera försiktigt den totala kullösningen av brunnen i spetsen och titta på botten av brunnarna.
- Om kulorna aspireras in i pipettspetsarna under steg med magnetisk separering ska du dispensera tillbaka kulorna till plattbrunnen på det magnetiska stativet. Vänta tills vätskan är klar (cirka två minuter) innan du fortsätter till nästa steg i proceduren.
- Vid tvättning av klor:
 - Använd det rekommenderade magnetiska stativet för plattan.

- Dispensera vätska direkt på pelleten så att kulorna på brunnarnas sidor blir blöta.
- Håll plattan på det magnetiska stativet tills förfarandet anvisar att avlägsna den.
- Skaka inte plattan när den står på det magnetiska stativet.
- Rubba inte pelleten när plattan står på det magnetiska stativet.
- Vid tvättning av kulator eller avlägsnande av supernatant ska du vinkla pipettspetsarna på botten av brunnarna för att undvika att ett vakuum skapas och att lösning dras in i pipettspetsens filter.

Antalet bibliotek och att välja index

Planera antalet provbibliotek och provindex för sekvenseringskörningen innan körningskonfigurationen. Positiva kontroller innefattas i följande riktlinjer om provantal, medan NTC:er inte gör det. NTC:er måste läggas till den planerade körningen som ett extra prov.

Indexprimrar identifierar varje unikt prov så att bibliotek kan poolas tillsammans för sekvensering på en flödescell. Indexet visas på skärmen Create Run (Skapa körning) under körningskonfigurationen i Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Tillsätt indexprimern i varje provbibliotek under biblioteksberedningen. *Använd olika indexprimerblandningar för varje provbibliotek.*

Indexerade bibliotek från samma prov delas upp i två anrikningar med två olika probuppsättningar. De resulterande två anrikade biblioteken delar samma index och måste sekvenseras på samma flödescell.

Se [Tabell 4](#) för minimi- och maximibibliotek för sekvens på en flödescell vid sekvensering.

Tabell 4 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Sekvensering

Bibliotekstyp	Anrikning	Minimum*	Högst*
DNA	OPD2	3	8
DNA HRD	OPD3	3	8

* NTC:er bidrar inte till plexiteten.

För optimal användning av reagenser vid sekvensering på NextSeq 550Dx-instrument, sekvensera 8 DNA (OPD2)-bibliotek och 8 DNA HRD (OPD3)-bibliotek per flödescell.

Kontrollera att de indexprimrar som du använder med prover överensstämmer med de index som du valde i Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). *Bristande överensstämmelse orsakar felaktig resultatrapportering på grund av förlust av positiv providentifikation.*

Det finns två typer av index (UPxx och CPxx) i TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

Vid sekvensering av det minsta antalet bibliotek (3 DNA-bibliotek och 3 DNA HRD-bibliotek) gäller följande krav:

- Använd inte CPxx-indexuppsättningar.
- En av följande UPxx-indexuppsättningar krävs för tillräcklig mångfald:
 - UP01, UP02 och UP03
 - UP04, UP05 och UP06

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

Till exempel tilldelas det första biblioteket UP01, det andra biblioteket UP02 och det tredje biblioteket UP03.

TruSight Oncology DNA Control v2

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kräver TruSight Oncology DNA Control v2 som en positiv kontroll. Inkludera TruSight Oncology DNA Control v2 för varje DNA-sekvenseringskörning inom en given biblioteksberedningshändelse. En unik positiv kontroll bereds för varje planerad sekvenseringskörning. För mer information, se Bipacksedel för TruSight Oncology DNA Control v2 (EU)..

Inmatningsmängden TruSight Oncology DNA Control v2 är 2 µl.

Inkludera en NTC i varje biblioteksberedning. NTC sekvenseras flera gånger inom en biblioteksberedning. Följ dessa riktlinjer för den positiva kontrollen och NTC:

- Bearbeta positiva kontroller och NTC:er identiskt med proverna. Den positiva kontrollen och NTC måste delas för anrikning med båda probuppsättningarna identiskt med proverna.
- Använd TEB för DNA NTC.
- De positiva kontrollerna inkluderas i maximikravet för bibliotek.
- NTC:er inkluderas inte i minimikravet för bibliotek.
- Använd UP-index för NTC när du sekvenserar det minsta antalet bibliotek.
- Eftersom NTC sekvenseras flera gånger kan inte det index som väljs för den här kontrollen upprepas i biblioteksberedningen.

I följande tabeller visas exempel på plattlayouter för arbetsflödet för biblioteksberedning ([Figur 1](#)). Varje numrerad kolumn representerar en sekvenseringskörning. NTC sekvenseras för varje kolumn eller uppsättning kolumner.

Tabell 5 Biblioteksberedningsplatta för en körning med sex patientprover

	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 Biblioteksberedningsplatta för tre körningar med 20 patientprover

	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

En överblick av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-arbetsflödet visas i [Figur 1](#) och [Figur 2](#).

Arbetsflöde för biblioteksberedning

[Figur 1](#) visar arbetsflödet för biblioteksberedning för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). Positiva kontroller och NTC:er bearbetas identiskt med prover. Säkra stoppunkter mellan stegen är markerade.

Innan du startar protokollet, ange körnings- och provinformation i Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive (EU, DRAGEN). Se *Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN), arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)*.

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

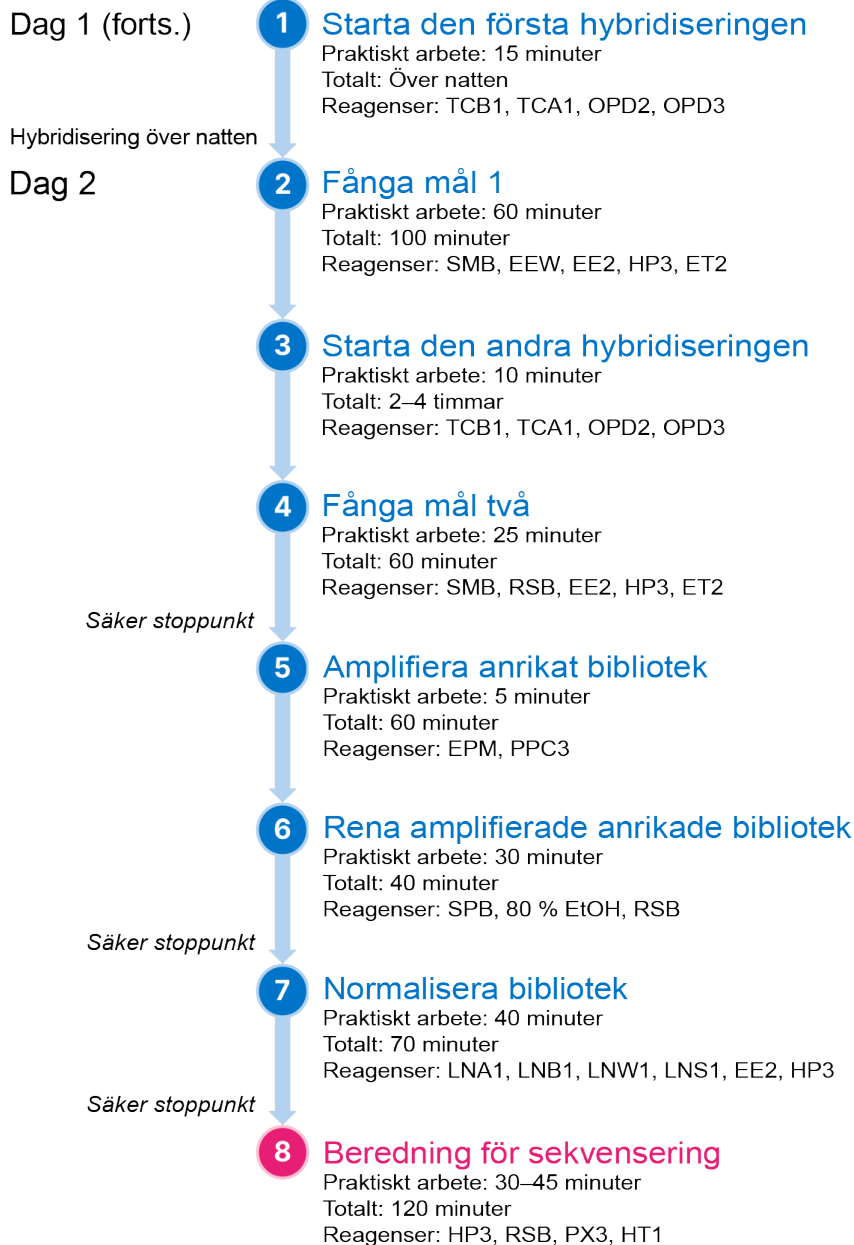


* Tiderna för praktiskt arbete och totala tider är ungefärliga.

Anrikningsarbetsflöde

Figur 2 visar anrikningsarbetsflödet. Säkra stoppunkter mellan stegen är markerade.

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



● Berikning

● Sekvenserings-
beredning

Programmera termocykler

Spara följande termocyklerprogram för post-amplifiering innan analysen startas.

Tabell 7 Termocyklerprogram för post-amplifiering

Förfarandesteg	Programnamn	Locktemperatur	Reaktionsvolym	Termocyklerparametrar
Index PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 15 cykler av: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i fem minuter • Förvara vid 10 °C
Utföra den första hybridiseringen	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minuter • 85 °C i två minuter och 30 sekunder • 75 °C i två minuter och 30 sekunder • 65 °C i två minuter och 30 sekunder • Förvara vid 57 °C i 8 till 24 timmar
Utföra den andra hybridiseringen	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C i 10 minuter • 85 °C i två minuter och 30 sekunder • 75 °C i två minuter och 30 sekunder • 65 °C i två minuter och 30 sekunder • Förvara vid 57 °C i 1,5 till 4 timmar
Amplifiera anrikat bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C i 30 sekunder • 18 cykler av: • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i fem minuter • Förvara vid 10 °C

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.



FÖRSIKTIGHET

Alla förfaranden i arbetsflödet kräver en RNas-/DNas-fri miljö.

1. Dekontaminera alla arbetsområden noggrant med ett RNas-/DNas-hämmande rengöringsmedel.
2. Följ tillverkarens anvisningar för att konfigurera ultrasonikatorn.
3. Ta ut DNA-kontroller från förvaringen.
4. Ta ut reagensröret från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna.

Tabell 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (artikelnr 20031119)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
TEB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fragmentera gDNA

Fragmentera gDNA

I den här processen fragmenteras gDNA och dsDNA-fragment med 3 tum eller 5 tum överhäng genereras.

Beredning

1. Följ rekommendationerna i [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 22](#) för att kvantifiera prover.
2. Förbered TEB – Blanda genom att vända upp och ned eller vortexblanda.

Förfarande

Bereda plattan

1. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med LP (biblioteksberedning).
Använd en PCR-platta om du stannar vid [SÄKER STOPPUNKT på sidan 38](#).
2. Täck över och ställ åt sidan för användning i [Överföra fragmenterat DNA på sidan 38](#).

Späda ut gDNA

1. Tina gDNA-prover och DNA-kontroller i rumstemperatur.
2. Pipettera varje gDNA-prov tio gånger för att blanda.
3. Centrifugera röret kort för att samla in droppar.
4. Blanda genom att vända på eller vortexblanda TEB.
5. Använd TEB för att förbereda varje gDNA-prov i en slutlig volym på 52 µl. Se följande tabell för inmatningsmängder och minsta koncentrationer baserat på provtyp.

- Analysen kräver en lägsta extraktionskoncentration för att tillåta minst 40 µl TEB av volymen på 52 µl.
- Använd 2 µl i en slutlig volym på 52 µl för DNA-kontroll.
- Pipettera inte mindre än 2 µl prov i den här spädningen för att undvika att prov går förlorat.

Provtyp	Inmatningsmängd (ng)	Minsta koncentration (ng/µl)
FFPE	40	3.33
Kontroll	40	20

Fragmentera

1. Tillsätt 52 µl av varje gDNA-prov i en separat brunn för ultrasonikatorröret.



FÖRSIKTIGHET

Tillsätt gDNA i röret långsamt och kontrollera att det inte förekommer några bubblor i röret eller några luftfickor längst ner i röret. Mer information finns i [Analys på sidan 25](#) och i tillverkarens anvisningar.

2. Registrera remsans riktning.
3. Fragmentera gDNA till fragment med ultrasonikatoren.

Överföra fragmenterat DNA

1. Kontrollera att provplattans layout och index för varje prov matchar den körning du väljer för analys med Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN).
2. Följ ultrasonikatortillverkarens anvisningar för att återställa provet.
Centrifugering behövs för att slå samman provet i vissa typer av ultrasonikatorrör.
3. För varje fragmenterat gDNA-prov ska du använda en pipett med smal spets för att göra tre överföringar på 16,7 µl till en tom brunn på LP-plattan.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på LP-plattan.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du applicera en självhäftande plattförsegling på LP PCR-plattan och centrifugera vid 280 × g i en minut. Förvara vid -25 °C till -15 °C i upp till sju dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

Kontrollera att termocyklerprogrammen för post-amplifiering är konfigurerade. Se [Programmera termocykler på sidan 36](#).

1. Förbered en ishink eller motsvarande.
2. Ta ut reagensrören från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna.

Tabell 9 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (artikelnr 20031118)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
ERA1-A	-25 °C till -15 °C	Förvara kallt.	Utföra End Repair och A-Tailing
ERA1-B	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Utföra End Repair och A-Tailing
ALB1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
LIG3	-25 °C till -15 °C	Förvara kallt.	Ligera adaptrar
UMI (vitt lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
STL	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Ligera adaptrar
EPM	-25 °C till -15 °C	Förvara kallt.	Index PCR

Tabell 10 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (artikelnr 20031119)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
SPB (ljusgrön märkning)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Rena efter ligering
RSB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Rena efter ligering

Tabell 11 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (artikelnr 20031120)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
UPxx	-25 °C till -15 °C	Tina lämpliga indexprimerrör till rumstemperatur.	Index PCR

Tabell 12 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (artikelnr 20031126)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
CPxx	-25 °C till -15 °C	Tina lämpliga indexprimerrör till rumstemperatur.	Index PCR

Utföra End Repair och A-Tailing

I den här processen repareras överhängen som uppstår vid fragmentering till ändar med överhängande A-svans med hjälp av en End Repair A-Tailing-masterblandning (ERA1).

3 tum till 5 tum exonukleasaktiviteten i den här blandningen avlägsnar 3 tum överhängen och 5 tum till 3 tum polymerasaktiviteten fyller i 5 tum överhängen. 3 tum ändarna får A-svansar under den här reaktionen för att förhindra att de ligerar till varandra under adapterligeringsreaktionen.

Beredning

1. Förvärm två mikroprovsinkubatorer med MIDI-värmeblocksinsatser enligt följande.
 - Förvärm en mikroprovsinkubator till 30 °C.
 - Förvärm en mikroprovsinkubator till 72 °C.

2. Bered följande reagenser.

- ERA1-A – centrifugera kort och pipettera därefter för att blanda. Förvara kallt.
- ERA1-B – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
Kontrollera om det förekommer precipitat. Om precipitat förekommer ska du värma röret till 37 °C och därefter pipettera för att blanda tills precipitatet har löst upp sig.

3. Bered ERA1-masterblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 13 ERA1-masterblandning*

Masterblandningskomponent	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Se [Hantering av reagenser på sidan 29](#) för beräkningar.

- Pipettera långsamt tio gånger för att blanda och centrifugera därefter kort. Förvara ERA1-masterblandningen kallt.
- Välj ett av följande alternativ för att bereda plattan:
 - Bered enligt följande om proverna finns på en MIDI-platta.
 - Märk om MIDI-plattan med LP2 (biblioteksberedning 2).
 - Om vissa prover finns på olika MIDI-plattor flyttar du alla prover till separata brunnar på samma MIDI-platta i enlighet med plattlayouten.
 - Bered enligt följande om plattan är fryst.
 - Tina LP PCR-plattan till rumstemperatur.
 - Centrifugera plattan vid 280 × g i en minut.
 - Pipettera tio gånger för att blanda.
 - Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med LP2 (biblioteksberedning 2).
 - Överför hela volymen på 50 µl av varje prov från LP PCR-plattan till motsvarande brunnar på LP2 MIDI-plattan.
 - Kassera LP PCR-plattan.

Förfarande

- Tillsätt 10 µl ERA1-masterblandning i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2.
- Kassera resterande ERA1-masterblandning.
- Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
- Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
- Inkubera i den förvärmade mikroprovsinkubatorn vid 30 °C i 30 minuter.
- Överför omedelbart till en andra förvärmad mikroprovsinkubator.

7. Inkubera vid 72 °C i 20 minuter.
8. Håll MIDI-plattan LP2 kall i fem minuter.

Ligera adaptrar

I den här processen ligeras adaptrar till ändarna av gDNA-fragmenten.

Beredning



FÖRSIKTIGHET

Använd endast UMI-adaptrar. SUA1-adaptrar tillhandahålls men krävs inte för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen.

1. Bered följande reagenser.
 - ALB1 – vortexblanda i minst 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - LIG3 – centrifugera kort och pipettera därefter för att blanda. Förvara kallt.
 - UMI – vortexblanda i minst 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - STL – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.

Förfarande

1. Avlägsna MIDI-plattan LP2 från isen eller motsvarande.
2. Tillsätt 60 µl ALB1 i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2. ALB1 är en trögflytande lösning. Pipettera långsamt för att minimera bubbelbildning.
3. Tillsätt 5 µl LIG3 i varje provbrunn.
4. Tillsätt 10 µl UMI (vitt lock) i varje provbrunn.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Inkubera i rumstemperatur i 30 minuter.
8. Vortexblanda STL och centrifugera sedan kort.
9. Tillsätt 5 µl STL i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2.
10. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
11. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.

Rena efter ligering

I den här processen används SPB för att rena de adapterligerade gDNA-fragmenten och oönskade produkter avlägsnas. Kulorna tvättas två gånger med ny 80-procentig etanol. De adapterligerade proven elueras med RSB.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - SPB – kontrollera att kulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
2. Bered ny 80-procentig EtOH i ett koniskt rör på 15 ml eller 50 ml.

Tabell 14 Förbered ny 80-procentig etanol

Reagens	4 bibliotek	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek
100 % ren EtOH	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNas/DNas-fritt vatten	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Vortexblanda ny 80-procentig EtOH.
4. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Vortexblanda SPB i en minut för att återsuspendera kulorna.
2. Tillsätt omedelbart 112 µl SPB i varje provbrunn på MIDI-plattan LP2.

Om du använder ett tråg för att dispensera SPB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,15 för att alikvotera tillräckligt med material per prov. Kassera eventuellt kvarvarande material när SPB har tillsatts i varje provbrunn.
3. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.

Försegla kanter och brunnar helt.
4. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
5. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
6. Placera MIDI-plattan LP2 på det magnetiska stativet i 10 minuter.
7. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje provbrunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

1. Tvätta kulorna enligt följande.
 - a. Låt MIDI-plattan LP2 vara kvar på det magnetiska stativet och tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH i varje provbrunn.
 - b. Vänta i 30 sekunder.
 - c. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje provbrunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta kulorna en **andra** gång.
3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EtOH från varje brunn.
4. Kassera den 80-procentiga EtOH som inte har använts.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan LP2 från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 27,5 µl RSB i varje provbrunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan LP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
6. Inkubera i rumstemperatur i två minuter.
7. Placera MIDI-plattan LP2 på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med LS (biblioteksprov).
9. Överför 25 µl av varje eluat från MIDI-plattan LP2 till motsvarande brunnar på PCR-plattan LS.
10. Kassera den tomma MIDI-plattan LP2.

Index PCR

I det här steget amplifieras biblioteksfragment med hjälp av primrar som tillför indexsekvenser för provmultiplexering. Den resulterande produkten innehåller det fullständiga biblioteket med DNA-fragment omgivna av adapttrar som krävs för klustergenerering.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - EPM – förvara kallt.
 - UPxx – vortexblanda och centrifugera kort.
 - CPxx – vortexblanda och centrifugera kort.

2. Kontrollera att indexen för varje prov överensstämmer med körningen som planerades i Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN) under körningskonfigurationen. Se till att följa instruktionerna för indexval i [Antalet bibliotek och att välja index på sidan 31](#).

**FÖRSIKTIGHET**

Bristande överensstämmelse mellan proven och indexprimrarna orsakar felaktig resultatrapportering på grund av förlust av positiv providentifikation.

Förfarande

1. Tillsätt 5 µl av lämplig indexprimer (UPxx eller CPxx) i motsvarande provbrunn på PCR-plattan LS i enlighet med de index som valdes.

**FÖRSIKTIGHET**

Hantera och öppna endast ett indexprimerrör åt gången. Sätt omedelbart ett nytt lock på varje indexrör efter användning. Kombinera inte indexprimrar med varandra.

2. Vortexblanda EPM i fem sekunder och centrifugera därefter kort.
3. Tillsätt 20 µl EPM i varje provbrunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan LS.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
5. Skaka vid 1 200 rpm i en minut.
6. Ställ tillbaka pre-amplifieringsreagenserna på förvaringsplatsen.

**FÖRSIKTIGHET**

Utför alla efterföljande steg i ett post-amplifieringsområde för att förhindra överföring av amplifieringsprodukt.

7. Centrifugera PCR-plattan LS vid 280 × g i en minut.
8. Placera den förprogrammerade termocyklern för post-amplifiering och kör I-PCR-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 36](#).
Om du fortsätter med [Starta den första hybridiseringen på sidan 45](#) ska du följa upptiningsanvisningarna för reagenser i avsnittet Beredning för protokollsteg.
9. Centrifugera PCR-plattan LS vid 280 × g i en minut efter att I-PCR-programmet har slutförts.
10. Märk om plattan med ALS (amplifierade biblioteksprover).

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du förvara PCR-plattan ALS vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till hybridiseringen över natten.

1. Kontrollera att termocyklerprogrammen för post-amplifiering är konfigurerade. Se [Programmera termocykler på sidan 36](#).
2. Ta ut reagensrören från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna.

Tabell 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20140116)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
TCB1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Tabell 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20140115)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
TCA1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Tabell 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (artikelnr 20031122)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
OPD2 (vitt lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Tabell 18 TruSight Oncology Comp HRD Content Set Box (artikelnr 20140117)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
OPD3 (blått lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den första hybridiseringen

Starta den första hybridiseringen

Under denna process hybridiseras två pooler av oligo (OPD2 och OPD3) till gDNA-bibliotek som bereds i [Index PCR på sidan 43](#). Anrikning av riktade regioner kräver två hybridiseringssteg. Vid den första hybridiseringen hybridiserades oligouppsättningen till gDNA-bibliotek över natten (8–24 timmar).

Beredning

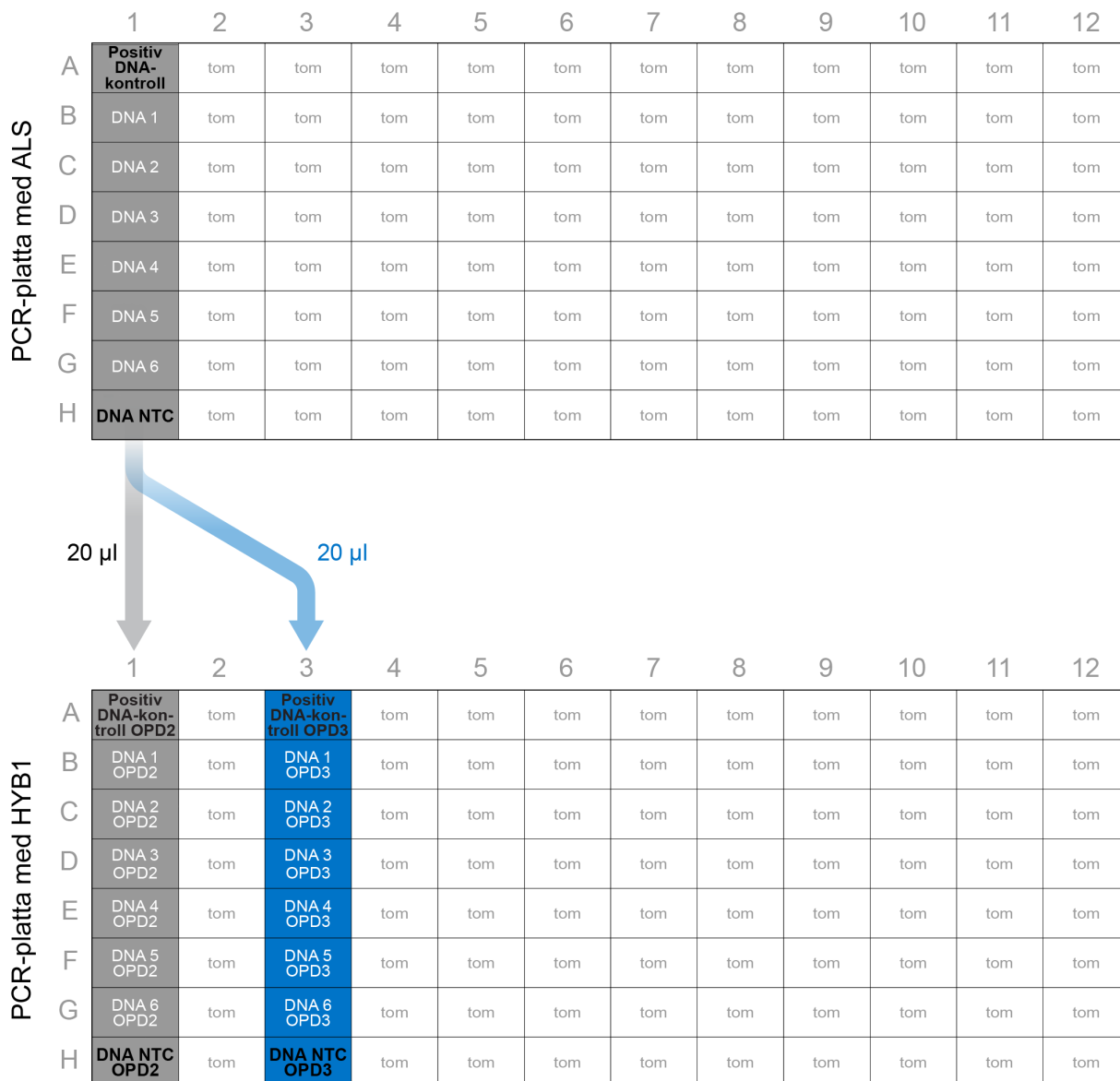
1. Bered följande reagenser.
 - TCB1 – värm röret vid 37 °C i fem minuter. Vortexblanda i 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - TCA1 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPD2 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPD3 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
2. Om PCR-plattan ALS har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och centrifugera vid 280 × g i en minut. Blanda genom att pipettera.

3. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med HYB1 (hybridisering 1).

Förfarande

- Överför 20 µl av varje gDNA-bibliotek från ALS PCR-plattan till motsvarande brunnar på HYB1 PCR-plattan för anrikning med OPD2-prober. Inkludera positiva kontroller och NTC:er för anrikning med OPD2-prober.
- Överför ytterligare 20 µl av gDNA-bibliotek från ALS PCR-plattan till en andra brunn på HYB1 PCR-plattan för anrikning med OPD3-prober, som visas på [Figur 3](#). Inkludera positiva kontroller och NTC:er för anrikning med OPD3-prober.

Figur 3 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) layout för första exempelplattan för hybridisering



3. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ALS och ställ undan. Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.

4. Kontrollera TCB1 om det förekommer precipitat. Om precipitat förekommer ska du värma röret igen och vortexblanda röret tills kristallerna har löst upp sig.
5. Tillsätt 15 µl TCB1 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan HYB1.
6. Tillsätt 10 µl TCA1 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan HYB1.
7. Tillsätt prober.
Kombinera *inte* olika typer av prober. Lägg endast till en probuppsättning per brunn.
 - **[DNA-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPD2 (vitt lock) i varje bibliotek som härrör från DNA.
 - **[DNA HRD-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPD3 (blått lock) i varje bibliotek som härrör från DNA för HRD-anrikning.
8. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan HYB1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
9. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
10. Placera på termocyklern och kör HYB1-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 36](#).
11. Hybridisera vid 57 °C i minst åtta timmar och högst 24 timmar.
12. Ställ tillbaka hybridiseringsreagenserna på förvaringsplatsen.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

Ta ut reagensrören från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna i början av dag två.

Tabell 19 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20140116)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
SMB (mörkblå märkning)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Fånga mål 1 Fånga mål 2
ET2	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fånga mål 1 Fånga mål 2
HP3	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fånga mål 1 Fånga mål 2 Normalisera bibliotek
TCB1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen
RSB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Fånga mål 2 Rena amplifierade anrikade bibliotek

Tabell 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20140115)

Reagens	Förvaring	Upptinningsanvisningar	Protokollsteg
EE2	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Fånga mål 1 Fånga mål 2 Normalisera bibliotek
EEW	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Fånga mål 1
TCA1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen

Tabell 21 TruSight Oncology Comp Content Set Box (artikelnr 20031122)

Reagens	Förvaring	Upptinningsanvisningar	Protokollsteg
OPD2 (vitt lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen

Tabell 22 TruSight Oncology Comp HRD Content Box (artikelnr 20140117)

Reagens	Förvaring	Upptinningsanvisningar	Protokollsteg
OPD3 (blått lock)	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Starta den andra hybridiseringen

Fånga mål 1

I det här steget används SMB för att fånga prober som är hybridiserade till det riktade intresseområdet. Kulorna tvättas med EEW tre gånger. De anrikade biblioteken elueras med ny EE2+HP3-elueringsblandning och neutraliseras med ET2.

Beredning

1. Förvärm en mikroprovsinkubator med en MIDI-värmeblocksinsats till 57 °C.
2. Bered följande reagenser.
 - EEW – vortexblanda i en minut.
 - EE2 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - HP3 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - SMB – kontrollera att kulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
Använd **SMB**, inte SPB, för det här förfarandet.
 - ET2 – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
3. Bered ny EE2+HP3-elueringsblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 23 EE2 + HP3-elueringsblandning för steget Fånga mål 1*

Komponent i elueringsblandning	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Se [Hantering av reagenser på sidan 29](#) för beräkningar.

- Vortexblanda EE2+HP3-elueringsblandningen och centrifugera sedan kort. Ställ undan för steget [Eluering på sidan 50](#).
- Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med CAP1 (Fånga 1).
- Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

- Avlägsna PCR-plattan HYB1 från termocyklern.
- Centrifugera PCR-plattan HYB1 vid 280 × g i en minut.
- Vortexblanda SMB i en minut för att återsuspendera kulorna.
Om precipitat eller pelleten förekommer, se till att uppnå rumstemperatur, pipettera uppåt och nedåt för att frigöra pelleten och vortexa sedan för att suspendera igen.
- Tillsätt omedelbart 150 µl SMB i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP1.
Om du använder ett tråg för att dispensera SMB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,05 vid alikvotering, för att möjliggöra tillräckligt med material per prov.
- Kassera eventuellt kvarvarande material när SMB har tillsatts i varje provbrunn.
- Ställ in pipetten på 50 µl och överför hela volymen av varje bibliotek från PCR-plattan HYB1 till motsvarande brunnar på MIDI-plattan CAP1.
- Kassera den tomma PCR-plattan HYB1.
- Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
- Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
- Inkubera i den förvärmade mikroprovsinkubatorn vid 57 °C i 25 minuter.
- Placera MIDI-plattan CAP1 på ett magnetiskt stativ i två minuter.
- Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.



FÖRSIKTIGHET

Fortsätt omedelbart till nästa steg ([Tvättning på sidan 50](#)). Låt inte pelleten ligga framme utan vätska under en längre tid.

Tvättning

1. Tvätta kulorna enligt följande.
 - a. Avlägsna MIDI-plattan CAP1 från det magnetiska stativet.
 - b. Tillsätt 200 µl EEW i varje brunn.
 - c. Använd en pipett inställd på 150 µl och pipettera minst tio gånger för att blanda. Kontrollera att alla kulor återsuspenderas.

Kontrollera att inga pellets förekommer genom att försiktigt aspirera alla brunnars lösning med kulor in i spetsen. Kontrollera botten av varje brunn visuellt. Om det finns en kulpellet ska du vinkla pipettspetsen mot pelleten under tvättningsstegen för att flytta på pelleten. Kontrollera att pelleten är helt nedsänkt i lösning. Lösningen ska vara mörkbrun och ha en homogen konsistens.
 - d. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP1.

Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
 - e. Skaka vid 1 800 rpm i fyra minuter.
 - f. Inkubera i en mikroprovsinkubator vid 57 °C i fem minuter.
 - g. Placera MIDI-plattan CAP1 på ett magnetiskt stativ i två minuter.
 - h. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta kulorna en **andra** gång.
3. Tvätta kulorna en **tredje** gång.
4. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EEW från varje brunn.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan CAP1 från det magnetiska stativet.
2. Vortexblanda ny EE2+HP3-elueringsblandning och centrifugera sedan kort.
3. Tillsätt försiktigt 17 µl EE2+HP3-elueringsblandning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP1.
4. Kassera resterande EE2+HP3-elueringsblandning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP1.

Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med ELU1 (eluering 1).
9. Vortexblanda ET2 och centrifugera sedan kort.
10. Tillsätt 5 µl ET2 i varje motsvarande biblioteksbrunn på den nya PCR-plattan ELU1.
11. Överför försiktigt 15 µl eluat från varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP1 till motsvarande brunnar på PCR-plattan ELU1.
12. Kassera den tomma MIDI-plattan CAP1.

13. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
14. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
15. Ställ tillbaka EEW på förvaringsplatsen.

Starta den andra hybridiseringen

I det här steget binds riktade regioner i anrikade gDNA-bibliotek med fångade prober en andra gång. Den andra hybridiseringen säkerställer hög specificitet för de fångade regionerna. Säkerställ optimal biblioteksanrikning genom att utföra det andra hybridiseringssteget vid 57 °C i minst en och en halv timme och högst fyra timmar.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - TCB1 – värm röret vid 37 °C i fem minuter. Vortexblanda i 10 sekunder och centrifugera därefter kort.
 - TCA1 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPD2 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.
 - OPD3 – vortexblanda och centrifugera därefter kort.

Förfarande

1. Kontrollera om det förekommer precipitat i TCB1. Om precipitat förekommer ska du värma röret igen och vortexblanda tills kristallerna har löst upp sig.
2. Tillsätt 15 µl TCB1 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan ELU1.
3. Tillsätt 10 µl TCA1 i varje biblioteksbrunn.
4. Tillsätt samma prob som användes under den första hybridiseringen till varje brunn. Lägg endast till en probuppsättning per brunn.
Kombinera *inte* olika typer av prober.
 - **[DNA-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPD2 (blått lock) i varje bibliotek som härrör från DNA för HRD-anrikning.
 - **[DNA HRD-biblioteksbrunnar]** – Tillsätt 5 µl OPD3 (blått lock) i varje bibliotek som härrör från DNA för HRD-anrikning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU1.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
6. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
7. Placera på en termocykler och kör HYB2-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 36](#).
8. Hybridisera vid 57 °C i minst en och en halv timme och högst fyra timmar.
9. Ställ tillbaka hybridiseringsreagenserna på förvaringsplatsen.

Fånga mål 2

I det här steget används SMB för att fånga prober som är hybridiserade till det riktade intresseområdet. Kulorna tvättas med RSB en gång. De anrikade biblioteken elueras med ny EE2+HP3-elueringsblandning och neutraliseras med ET2.

Beredning

1. Förvärm en mikroprovsinkubator med MIDI-värmeblocksinsats till 57 °C.
2. Bered följande reagenser.
 - EE2 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - HP3 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - SMB – kontrollera att kulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter. Använd **SMB**, inte SPB, för det här förfarandet.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
 - ET2 – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
3. Bered ny EE2+HP3-elueringsblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 24 EE2 + HP3 elueringsblandning för steget Fånga mål två*

Komponent i elueringsblandning	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
EE2	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Se [Hantering av reagenser på sidan 29](#) för beräkningar.

4. Vortexblanda och centrifugera sedan kort. Ställ undan för steget [Eluering på sidan 53](#).
5. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med CAP2 (fånga 2).
6. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Avlägsna PCR-plattan ELU1 från termocyklern.
2. Centrifugera PCR-plattan ELU1 vid 280 × g i en minut.
3. Vortexblanda SMB i en minut för att återsuspendera kulorna.
4. Tillsätt omedelbart 150 µl SMB i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP2.
Om du använder ett tråg för att dispensera SMB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,05 vid alikvotering, för att möjliggöra tillräckligt med material per prov.
5. Kassera eventuellt kvarvarande material när SMB har tillsatts i varje provbrunn.

6. Ställ in pipetten på 50 µl och överför hela volymen av varje bibliotek från PCR-plattan ELU1 till motsvarande brunnar på MIDI-plattan CAP2.
7. Kassera den tomma PCR-plattan ELU1.
8. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
9. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
10. Inkubera i en mikroprovsinkubator vid 57 °C i 25 minuter.
Om du fortsätter med [Amplifiera anrikat bibliotek på sidan 54](#) ska du följa upptiningsanvisningarna för reagenser i avsnittet [Förbered för protokoll](#).
11. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
12. Håll MIDI-plattan CAP2 på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.

**FÖRSIKTIGHET**

Fortsätt omedelbart till nästa steg ([Tvättning på sidan 53](#)). Låt inte pelleten ligga framme utan vätska under en längre tid.

Tvättning

1. Avlägsna MIDI-plattan CAP2 från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 200 µl RSB i varje brunn.
4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i fyra minuter.
6. Ställ plattan på det magnetiska stativet i två minuter.
7. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
8. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande RSB från varje brunn.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan CAP2 från det magnetiska stativet.
2. Vortexblanda ny EE2+HP3-elueringsblandning och centrifugera sedan kort.
3. Tillsätt 22 µl EE2+HP3-elueringsblandning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP2.
4. Kassera resterande EE2+HP3-elueringsblandning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan CAP2.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.

7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med ELU2 (eluering 2).
9. Vortexblanda ET2 och centrifugera sedan kort.
10. Tillsätt 5 µl ET2 i varje motsvarande biblioteksbrunn på den nya PCR-plattan ELU2.
11. Överför försiktigt 20 µl eluat från varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan CAP2 till motsvarande brunnar på PCR-plattan ELU2.
12. Kassera den tomma MIDI-plattan CAP2.
13. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
14. Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
15. Ställ tillbaka SMB, EE2, HP3, RSB och ET2 på förvaringsplatsen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan ELU2 vid $280 \times g$ i en minut och förvara den vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

1. Förbered en ishink eller motsvarande.
2. Ta ut reagensrören från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna.

Tabell 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20140115)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
PPC3	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina till rumstemperatur.	Amplifiera anrikat bibliotek
EPM	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara kallt.	Amplifiera anrikat bibliotek

Tabell 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20140116)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
SPB (ljusgrön märkning)	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Rena amplifierade anrikade bibliotek
RSB	$2\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Förvara i rumstemperatur.	Rena amplifierade anrikade bibliotek Beredning för sekvensering

Amplifiera anrikat bibliotek

I det här steget används primrar för att amplifiera anrikade bibliotek.

Beredning

- Om ELU2-plattan har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och därefter centrifugera vid $280 \times g$ i en minut.

Förfarande

- Vortexblanda PPC3 och centrifugera därefter kort.
- Tillsätt 5 µl PPC3 i varje biblioteksbrunn på PCR-plattan ELU2.
- Vortexblanda EPM i fem sekunder och centrifugera därefter kort.
- Tillsätt 20 µl EPM i varje biblioteksbrunn.
- Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan ELU2.
Försegla kanter och brunnar helt för att förhindra avdunstning.
- Skaka vid 1 200 rpm i två minuter.
- Placera på en termocykler och kör EL-PCR-programmet.
Se [Programmera termocykler på sidan 36](#).
Om du fortsätter med [Normalisera bibliotek på sidan 58](#) ska du följa upptiningsanvisningarna i avsnittet [Förbered för protokoll](#).
- Ställ tillbaka PPC3 och EPM på förvaringsplatsen.

Rena amplifierade anrikade bibliotek

I det här steget används SPB för att rena de anrikade biblioteken från oönskade reaktionskomponenter. Kulorna tvättas två gånger med ny 80-procentig etanol. Biblioteken elueras med RSB.

Beredning

- Bered följande reagenser.
 - SPB – kontrollera att kulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter. Använd *SPB* och inte *SMB* för det här förfarandet.
 - RSB – ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
- Bered ny 80-procentig etanol i ett koniskt rör på 15 ml eller 50 ml.

Tabell 27 Förbered ny 80-procentig etanol

Reagens	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
100 % ren EtOH	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNas/DNas-fritt vatten	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Vortexblanda ny 80-procentig EtOH.
- Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med BIND2 (reningsbindning).
- Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

1. Avlägsna PCR-plattan ELU2 från termocyklern.
2. Centrifugera PCR-plattan ELU2 vid 280 × g i en minut.
3. Vortexblanda SPB i en minut för att återsuspendera kulorna.
4. Tillsätt omedelbart 110 µl SPB i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BIND2.
Om du använder ett tråg för att dispensera SPB ska du inkludera en överskottsfaktor på 1,15 för att alikvotera tillräckligt med material per prov. Kassera eventuellt kvarvarande material när SPB har tillsatts i varje provbrunn.
5. Överför 50 µl av varje bibliotek från PCR-plattan ELU2 till motsvarande brunnar på MIDI-plattan BIND2.
6. Kassera den tomma PCR-plattan ELU2.
7. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BIND2.
Försegla kanter och brunnar helt.
8. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
9. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
10. Placera MIDI-plattan BIND2 på ett magnetiskt stativ i fem minuter.
11. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

1. Tvätta kulorna enligt följande.
 - a. Låt BIND2 MIDI-plattan vara kvar på det magnetiska stativet och tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH i varje brunn.
 - b. Vänta i 30 sekunder.
 - c. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta kulorna en **andra** gång.
3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande EtOH från varje brunn.
4. Kassera den 80-procentiga EtOH som inte har använts.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan BIND2 från det magnetiska stativet.
2. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
3. Tillsätt 32 µl RSB i varje biblioteksbrunn.

4. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BIND2.
Försegla kanter och brunnar helt.
5. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
6. Inkubera i rumstemperatur i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med PL (renade bibliotek).
9. Överför 30 µl av varje eluat från MIDI-plattan BIND2 till motsvarande brunnar på PCR-plattan PL.
10. Kassera den tomma MIDI-plattan BIND2.
11. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan PL.
12. Ställ tillbaka SPB och RSB på förvaringsplatsen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan PL vid 280 × g i en minut och förvara den vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till nästa säkra stoppunkt.

1. Ta ut reagensrören från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna.

Tabell 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20140115)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
LNA1	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Normalisera bibliotek
EE2	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur.	Normalisera bibliotek

Tabell 29 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20140116)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
LNB1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur i 30 minuter.	Normalisera bibliotek
HP3	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Normalisera bibliotek Beredning för sekvensering
LNW1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Normalisera bibliotek
LNS1	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Normalisera bibliotek

2. Om du fortsätter med [Beredning för sekvensering på sidan 61](#) samma dag, ska du följa upptiningsanvisningarna i avsnittet Beredning för protokoll.

Normalisera bibliotek

I den här processen används LNB1 och tillsatser (LNA1) för att normalisera antalet i varje bibliotek för att säkerställa en enhetlig biblioteksrepresentation i poolade bibliotek. Kulorna tvättas med LNW1 två gånger. Biblioteken elueras med ny EE2+HP3-elueringsblandning och neutraliseras med LNS1.

Beredning

1. Bered följande reagenser.
 - LNB1 – kontrollera att kulorna förvaras i rumstemperatur i 30 minuter.
 - LNA1 – vortexblanda.
 - EE2 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - HP3 – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - LNW1 – vortexblanda. Ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
 - LNS1 – vortexblanda. Ställ undan tills den ska användas i förfarandet.
2. Vortexblanda LNB1 i en minut för att återsuspendera kulorna.
Vänd LNB1-röret för att kontrollera att alla kulor är återsuspenderade.
3. Upprepa pulsvortex i 1 minut om en pellet observeras.
4. Använd en pipett inställd på 800 µl och pipettera LNB1 upp och ner tio gånger för att säkerställa återsuspension.
5. Bered omedelbart ny LNA1+LNB1-masterblandning i ett koniskt rör.



FÖRSIKTIGHET

Återsuspendera LNB1-pelleten helt längst ner i röret för att förhindra inkonsekvent klusterdensitet.

Tabell 30 LNA1 + LNB1-masterblandning*

Masterblandningskomponent	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
LNA1	610 µl	1 219 µl	1 829 µl	3 658 µl
LNB1	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Se [Hantering av reagenser på sidan 29](#) för beräkningar.

6. Vortexblanda LNA1+LNB1-masterblandningen. Ställ undan för steget [Bindning på sidan 59](#).

7. Bered ny EE2+HP3-elueringsblandning i ett mikrocentrifugrör.

Tabell 31 EE2 + HP3-elueringsblandning för normaliserade bibliotek*

Komponent i elueringsblandning	8 bibliotek	16 bibliotek	24 bibliotek	48 bibliotek
EE2	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Den här tabellen innefattar volymöverskott. Se [Hantering av reagenser på sidan 29](#) för beräkningar.

8. Vortexblanda ny elueringsblandning och centrifugera sedan kort. Ställ undan för steget [Eluering på sidan 60](#).
9. Om PCR-plattan PL har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och centrifugera vid $280 \times g$ i en minut. Blanda genom att pipettera.
10. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med BBN (kulbaserad normalisering).
11. Ställ fram magneten.

Förfarande

Bindning

- Vortexblanda LNA1+LNB1-masterblandningen.
- Tillsätt omedelbart 45 µl LNA1+LNB1-masterblandning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BBN.
- Kassera resterande LNA1+LNB1-masterblandning.
- Tillsätt 20 µl av varje bibliotek från PCR-plattan PL till motsvarande brunnar på MIDI-plattan BBN.
- Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BBN.
Försegla kanter och brunnar helt.
- Skaka vid 1 800 rpm i 30 minuter.
- Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan PL och förvara igen.
- Placera MIDI-plattan BBN på ett magnetiskt stativ i två minuter.
- Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.

Tvättning

- Tvätta kulorna enligt följande.
 - Avlägsna MIDI-plattan BBN från det magnetiska stativet.
 - Tillsätt 45 µl LNW1 i varje biblioteksbrunn.
 - Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BBN.
Försegla kanter och brunnar helt.
 - Skaka vid 1 800 rpm i fem minuter.

- e. Placera MIDI-plattan BBN på ett magnetiskt stativ i två minuter.
- f. Håll plattan på det magnetiska stativet. Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
2. Tvätta kulorna en *andra* gång.
3. Använd en pipett med smal spets för att avlägsna kvarvarande supernatant från varje brunn.

Eluering

1. Avlägsna MIDI-plattan BBN från det magnetiska stativet.
2. Vortexblanda ny EE2+HP3-elueringsblandning och centrifugera sedan kort.
3. Tillsätt 32 µl EE2+HP3-lösning i varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BBN.
4. Kassera resterande elueringsblandning.
5. Applicera självhäftande plattförsegling på MIDI-plattan BBN.
Försegla kanter och brunnar helt.
6. Skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
7. Placera på ett magnetiskt stativ i två minuter.
8. Märk en ny PCR-platta med 96 brunnar med NL (normaliserade bibliotek).
9. Överför försiktigt 30 µl eluat från varje biblioteksbrunn på MIDI-plattan BBN till motsvarande brunnar på PCR-plattan NL.



FÖRSIKTIGHET

Om kulorna aspireras in i pipettspetsarna ska du dispensera tillbaka kulorna till plattan på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är transparent (cirka två minuter) innan du fortsätter till nästa steg av förfarandet.

10. Kassera den tomma MIDI-plattan BBN.
11. Vortexblanda LNS1.
12. Tillsätt 30 µl LNS1 i varje biblioteksbrunn på den nya PCR-plattan NL.
13. Blanda genom att pipettera fem gånger.
14. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan NL.
Försegla kanter och brunnar helt.
15. Ställ tillbaka LNB1, LNA1, EE2, LNW1 och LNS1 på förvaringsplatsen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet ska du centrifugera PCR-plattan NL vid 280 × g i en minut och förvara den vid -25 °C till -15 °C i upp till 32 dagar.

Förbered för protokoll

Denna förberedelse krävs för att utföra protokollstegen som leder fram till sekvensering.

Inled beredningen av förbrukningsmaterial för sekvensering från NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) (artikelnummer 20028871) minst en timme innan användning.

1. Ta ut biblioteksspädningsbufferten (HT1) från förvaringen vid -25 °C till -15 °C. Tina till rumstemperatur. Förvaras kallt efter upptining.
2. Följ beredningsanvisningarna i *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)* för andra förbrukningsmaterial i satsen.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykler)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cykler)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cykler)
3. Ta ut reagensrören från förpackningen och följ upptiningsanvisningarna.

Tabell 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (artikelnr 20031121)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
PhiX Control	-25 °C till -15 °C	Tina till rumstemperatur. Förvaras kallt efter upptining.	Beredning för sekvensering

Tabell 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20031123) utöver TruSight Oncology Comp HRD Enrichment (Refrigerate) Box (artikelnr 20140116)

Reagens	Förvaring	Upptiningsanvisningar	Protokollsteg
HP3	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Beredning för sekvensering
RSB (rosa märkning)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur.	Beredning för sekvensering

Beredning för sekvensering

Varje DNA-sekvenseringskörning ska inkludera en positiv kontroll och en NTC. NTC sekvenseras så många gånger som det behövs för att varje körning ska innehålla en NTC. Varje körning inkluderar en separat positiv kontroll.

Beredning

1. Gå igenom riktlinjerna för [Antalet bibliotek och att välja index på sidan 31](#).
2. Märk ett mikrocentrifugrör med dHP3 (utspädd HP3).
3. Märk ett mikrocentrifugrör med dPhiX (utspädd PhiX).
4. Förvärm ett värmeblock till 96 °C för mikrocentrifugrör.
5. Förbered en ishink eller motsvarande.

Späd och denaturera PhiX Control

1. Vortexblanda HP3 och centrifugera sedan kort.

2. Överför följande volymer till dHP3-mikrocentrifugröret.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNAs/DNAs-fritt vatten
3. Vortexblanda dHP3 och centrifugera sedan kort.
4. Blanda genom att vända på eller vortexblanda RSB.
5. Vortexblanda PhiX Control och centrifugera sedan kort.
6. Överför följande volymer till PhiX-mikrocentrifugröret.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX Control
7. Tillsätt 10 µl dHP3 i dPhiX-röret.
8. Kassera dHP3-röret.
9. Vortexblanda dPhiX-röret och centrifugera sedan kort.
10. Inkubera dPhiX i rumstemperatur i fem minuter för att denaturera.
11. Vortexblanda HT1.
12. Tillsätt omedelbart 980 µl förkyld HT1 till dPhiX.
13. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
14. Förvara dPhiX kallt tills den ska användas i beredningen för den andra spädningen.
Den slutliga koncentrationen är 20 pM dPhiX.
15. Ställ tillbaka PhiX, HP3 och RSB på förvaringsplatsen.

Poola och denaturera bibliotek

1. Om PCR-plattan NL har förvarats ska du tina den till rumstemperatur och därefter centrifugera plattan vid $280 \times g$ i en minut.
2. Använd en pipett med flera kanaler inställd på 30 µl och pipettera försiktigt biblioteken på PCR-plattan NL fem gånger för att blanda.
Använd nya spetsar för varje bibliotek.



FÖRSIKTIGHET

Var noga med att blanda biblioteken väl för optimal prestanda.

3. Märk ett mikrocentrifugrör med PDL (poolade DNA-bibliotek).
4. Märk ett mikrocentrifugrör med PHL (poolade HRD-bibliotek).
5. Överför 10 µl av varje normaliserat OPD2-anrikat DNA-bibliotek från NL-plattan till PDL-röret.
Poola inte två bibliotek med samma indexprimer.
6. Överför 10 µl av varje normaliserat OPD3-anrikat DNA HDR-bibliotek från NL-plattan till PHL-röret.
Poola inte två bibliotek med samma indexprimer.
7. Applicera självhäftande plattförsegling på PCR-plattan NL.

Försegla kanter och brunnar helt.

8. Vortexblanda PDL- och PHL-rör.
9. Centrifugera PDL- och PHL-rören kort.
10. Inkubera PDL- och PHL-rör på ett värmeblock vid 96 °C i två minuter.
11. Placera PDL- och PHL-rören på is i fem minuter.
12. Vortexblanda PDL- och PHL-rören och centrifugera sedan kort.
13. Placera PDL- och PHL-rören på is igen.

Beredning av första spädningen

1. Märk ett mikrocentrifugrör med DIL1 (spädning 1).
2. Överför 20 µl PDL till det tomma DIL1-röret.
3. Kassera PDL-röret.
4. Tillsätt 5 µl PHL till DIL1.
5. Tillsätt 475 µl förkyld HT1 till DIL1-röret (1:20 spädning).
6. Vortexblanda DIL1-röret och centrifugera sedan kort.
7. Kassera PHL-röret.
8. **[Felsökning]** Efter sekvenseringen, om körningsrelaterade eller systemiska kvalitetskontrollfel i biblioteket kopplade till pärlbaserad normalisering observeras, fortsätt till [Felsökningsarbetsflöde: Beredning av den andra spädningen på sidan 64](#).

Beredning av den andra spädningen

1. Märk ett 2,0 ml mikrocentrifugrör med DIL2 (spädning 2).
2. Överför 40 µl DIL1 till det tomma DIL2-röret.
3. Kassera DIL1-röret.
4. Tillsätt 1 660 µl förkyld HT1 till DIL2-röret (1:850 spädning).
5. Vortexblanda beredd 20 pM dPhiX och centrifugera sedan kort.
6. Tillsätt 2,5 µl beredd 20 pM dPhiX till DIL2-röret.
7. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
8. För över 1 300 µl DIL2 till tinade NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykler).
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.
9. Kassera DIL2-röret.
10. Centrifugera PCR-plattan NL vid 280 × g i en minut och förvara vid -25 °C till -15 °C i upp till 32 dagar.
11. Fortsätt till sekvensering.
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Felsökningsarbetsflöde: Beredning av den andra spädningen

Använd det här felsökningsarbetsflödet när kvalitetskontrollfel på körningsnivå eller systembibliotek som är förknippade med kulbaserad normalisering efter sekvensering observeras (se [Felsökning på sidan 69](#) för mer information). Klusterdensiteter utanför intervallet 170–220 K/mm² ska inte justeras om de inte är förknippade med ett kvalitetskontrollfel. När du har slutfört steget *Beredning av första spädningen* ska du bereda en andra spädning med hjälp av justerade DIL1- och HT1-volymer.

OBS! Den justerade andra spädningen tillämpas per biblioteksberedning. Efter att hög eller låg klusterdensitet orsakar en ogiltig sekvenseringskörning eller en ogiltig biblioteks kvalitetskontroll kan efterföljande körningar från samma biblioteksberedning justeras med samma klusterdensitetsvärde. Körningar från en ny biblioteksberedning följer standardarbetsflödet.

1. Använd [Tabell 34](#) för att hitta klusterdensitetsintervallet (K/mm²) inklusive det värde som observerats i sekvenseringskörningen. Notera motsvarande justerad volym för DIL1 (µl) och HT1 (µl). Den kombinerade reagensvolymen är alltid 1 700 µl och matchar den nominella spädningsvolymen.

Tabell 34 Volymjusteringar baserade på klusterdensitet

Klusterdensitetsintervall (K/mm ²)	Volym DIL1 (µl)	Volym HT1 (µl)
≤ 50	199	1501
51–70	169	1531
71–90	123	1577
91–110	95	1605
111–130	76	1624
131–150	63	1637
151–169	53	1 647
170–220	40	1660
221–240	31	1669
241–260	28	1672
261–280	25	1675
281–300	22	1678
≥ 300	21	1679

2. Märk ett 2,0 ml mikrocentrifugrör med TDIL2 (felsökningsspädning 2).
3. Överför volymen av DIL1 från [Tabell 34](#) till det tomma TDIL2-röret.
4. Kassera DIL1-röret.
5. Tillsätt volymen av förkyld HT1 från [Tabell 34](#) till TDIL2-röret.

6. Vortexblanda beredd 20 pM dPhiX och centrifugera sedan kort.
7. Tillsätt 2,5 µl beredd 20 pM dPhiX till TDIL2-röret.
8. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
9. För över 1 300 µl TDIL2 till tinade NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.
10. Kassera TDIL2-röret.
11. Centrifugera PCR-plattan NL vid 280 × g i en minut och förvara därefter vid -25 °C till -15 °C i upp till 32 dagar.
12. Fortsätt till sekvensering.
För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Tolkning av resultat

Sekvenseringsresultaten från TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen rapporteras för varje individuellt prov i en PDF-rapport och en JSON-rapport. En rapport om lågt djup (`LowDepthReport.tsv`) genereras även på provnivå.

På körningsnivån genereras följande utdatafiler:

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

Endast varianter som blir godkända i kvalitetskontrollen visas i PDF- och JSON-rapporterna.

Detaljerad analysinformation finns i *Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN), arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)*.

Resultat från produkter för behandlingsvägledande diagnostik

Det finns tre möjliga resultat för CDx-avsedd användning:

- **Positiv** – En variant eller biomarkör identifieras (CDx).
- **Detekterades inte** – Inga varianter eller biomarkörer som är associerade med den CDx-avsedda användningen identifierades i provet. Cancertypen som är vald för provet är lämplig för CDx.
- **Inget resultat** – Det går inte att fastställa en variant- eller biomarkörstatus av en eller flera av följande anledningar:
 - Sekvenseringskörningen blev inte godkänd enligt kvalitetskontrollspecifikationerna.
 - Biblioteket blev inte godkänt enligt kvalitetskontrollspecifikationerna. För kvalitetskontrollkategorier som godkändes detekterades inga kompletterande diagnostiska varianter eller biomarkörer.
 - Biblioteket uppfyllde inte de erforderliga specifikationerna för NTC och positiv kontroll.

Alla CDx-resultat rapporteras i avsnittet Resultat från produkt för behandlingsvägledande diagnostik i JSON-rapporten. Endast positiva resultat listas i avsnittet Resultat från produkt för behandlingsvägledande diagnostik i PDF-rapporten.

Kvalitetskontroll

Sekvenseringskörning, bibliotek och kontrollvaliditet fastställs automatiskt och rapporteras av Analysmodulen TSO Comprehensive (EU, DRAGEN). Se [Tabell 35](#) och [Tabell 36](#) för kvalitetskontrollmått och specifikationer som tillämpas för sekvenseringskörning, bibliotek och kontroller. Om den positiva kontrollen eller NTC inte uppfyller specifikationerna ogiltigförklarar programvaran automatiskt patientprover baserat på kontrollprovresultat. Detaljerad analysinformation finns i *Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN), arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)*. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-rapporten, som är tillgänglig i PDF- och JSON-format, sammanfattar kvalitetskontrollresultaten. Rapportfilerna finns i analysmappen. Se *Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN), arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)* för platsen för analysmappen (innehåller PDF- och JSON-rapporter) samt körningsmappen.

Ogiltiga sekvenseringskörningar och bibliotek ska upprepas. Mer information om att upprepa sekvenseringskörningar eller tester av bibliotek finns i [Felsökning på sidan 69](#). Utför ytterligare kvalitetskontrollsmätningar enligt laboratoriets kvalitetsledningssystem i enlighet med lokala, nationella och/eller federala föreskrifter eller ackrediteringskrav.

Mer information om nukleinsyrekvantifiering och minimikrav på material finns i avsnittet [Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 22](#).

Tabell 35 Kvalitetskontrollmått för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultatrapporten

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning	Påverkan av specifikationsfel*
Sekvenseringskörning	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Procentandel avläsningar som passerar filtret (PF).	Sekvenseringskörningen ogiltigförklarad. Inga resultat rapporteras för något prov i körningen.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Genomsnittlig procentandel basbestämningar med ett kvalitetsresultat på minst Q30 för Read 1 (Avläsning 1).	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Genomsnittlig procentandel basbestämningar med ett kvalitetsresultat på minst Q30 för Read 2 (Avläsning 2).	

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning	Påverkan av specifikationsfel*
DNA-bibliotek	CONTAMINATION_SCORE	$\leq 1\,457$	Kontamineringsresultat baserat på VAF-fördelningen (variantallelfrekvens) av SNP:er.	Inga DNA-resultat rapporteras.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Medianvärdet för fragmentlängd i provet	Inga resultat för små BRCA DNA-varianter rapporteras.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (antal)	≥ 150	Täckning av medianexonfragment för alla exonbaser.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procentandel exonbaser med 50x fragmenttäckning.	
	PCT_CHIMERIC_READS (%)	≤ 8	Procentandel chimära avläsningar.	Inga resultat för stora BRCA-omstruktureringar rapporteras.
	GENE_SCALED_MAD (antal)	$0 \leq x \leq 0,134$	Medianen av absoluta avvikelser från medianen av normaliserade värden för varje CNV-riktad region.	
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (antal)	$\geq 1,0$	Medianvärdet för diskreta värden per CNV-mål.	
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	$\geq 50,0$	Procentandel HRD med 50x fragmenttäckning.	Inget GIS-resultat rapporterat.
	EXCESSIVE_TF (antal)	≤ 0	Felmått som indikerar om tumörfraktionen är för hög och om tumör- och normalsignaler inte längre kan särskiljas vid beräkning av GIS.	

* Lyckade resultat visas som PASS (GODKÄND).

Tabell 36 Kontrollmått för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultatrapporten

Utdatatyp	Mätvärde	Specifikation	Påverkan av specifikationsfel*
DNA Positive Control (Positiv DNA-kontroll)	Känslighet för små DNA-varianter	51 av 54 angivna varianter detekterades	Programvaran ogiltigförklarar automatiskt patientprover baserat på kontrollprovsresultat. Inga resultat för små BRCA DNA-varianter rapporteras.
	Genamplifieringskänslighet	3 av 3 angivna varianter detekterades	Programvaran ogiltigförklarar automatiskt patientprover baserat på kontrollprovsresultat. Inga resultat för stora BRCA-omstruktureringar rapporterades.
	PCT_TARGET_HRD_50X (%)	≥ 50	Programvaran ogiltigförklarar automatiskt patientprover baserat på kontrollprovsresultat. Inget GIS-resultat rapporterat.
DNA No-Template Control (Negativ DNA-kontroll)	MEDIAN_EXON_COVERAGE	≤ 8	Programvaran ogiltigförklarar automatiskt patientprover baserat på kontrollprovsresultat. Inga resultat för små BRCA DNA-varianter och stora BRCA-omstruktureringar rapporterades.
	MEDIAN_TARGET_COVERAGE	≤ 2	Programvaran ogiltigförklarar automatiskt patientprover baserat på kontrollprovsresultat. Inget GIS-resultat rapporterat.

* Lyckade resultat visas som PASS (GODKÄND).

Felsökning

Använd [Tabell 37](#) för att felsöka problem i arbetsflödet. Ytterligare felsökning kan krävas om en sekvenseringskörning eller biblioteksberedning för ett prov misslyckas två gånger. Kontakta Illumina teknisk support.

Innan du vidtar de rekommenderade felsökningsåtgärderna ska du överväga de två allmänna kategorierna av orsaker till att bibliotek inte klarar specifikationerna för kvalitetskontroll (QC). När DNA-bibliotek inte klarar kvalitetskontrollen är den underliggande orsaken vanligtvis antingen *provspecifik* eller *brunnsspecifik* eller *systemisk* för arbetsflödet.

Prov- eller brunnsspecifika fel kan bero på hanteringsfel eller inneboende provkvalitet. Systemfel kan uppstå vid användning, utrustning, reagens eller reagenshantering och kan påverka flera bibliotek. Systemiska fel är mest sannolika när alla bibliotek misslyckas i kvalitetskontroll, men variabilitet i provkvalitet kan leda till systemfel som endast påverkar en delmängd av bibliotek eller ett enda bibliotek.

Analysera följande mått för att identifiera den troliga källan till det ogiltiga resultatet.

- Inspektera de totala PF-avläsningarna (expanderat mått) för varje bibliotek från `MetricsOutput.tsv`. Liknande värden indikerar ett systemiskt problem, medan låga totala PF-avläsningar för ett eller några få prover, inklusive prover som inte klarar bibliotekskvalitetskontroll, antyder ett prov- eller brunnnsproblem.
- Inspektera de totala PF-avläsningarna för den DNA-positiva kontrollen i `<run folder>/<analysis folder>/Logs_Intermediates/DnaQCMetrics/<control ID>/<control ID-DNA.aligned.metrics.json>` och jämför måttet med historiska värden. En minskning av detta mått för en positiv kontroll kan tyda på ett systemiskt problem.

Om en sekvenseringskörning inte klarar specifikationerna för körningskvalitetskontroll är orsaken ett systemfel.

Tabell 37 TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) Felsökning

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Sekvenseringskörningen blir inte godkänd i kvalitetskontrollens specifikationer.	- Fel vid poolning - Fel vid spädning - Problem med beredning av förbrukningsmaterial för sekvensering (t.ex. inte tillräckligt tinat, kondens/smuts på flödescellen)	Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 61 .
	Kulbaserad normalisering: hög klusterdensitet	Om ett listat fel misstänks ska du korrigera problemet och återställa biblioteken från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 61. Om inga av de andra angivna felen misstänks kan koncentrationen av kulor från LNB1-reagensröret ha orsakat hög klusterdensitet. Detta kan bero på otillräcklig kulblandning. Hitta klusterdensitetsvärdet från <code>RunCompletionStatus.xml</code> i körningsmappen. Det optimala klusterdensitetsintervallet är 170–220 K/mm², men högre värden kan fortfarande producera körningar som klarar QC-specifikationerna. Om klusterdensiteten ligger över det optimala intervallet och sekvenseringskörningen inte klarade QC-specifikationerna kan biblioteken från PCR-plattan normaliserade bibliotek (NL) likställas med och justeras till den andra spädningen. Upprepa Beredning för sekvensering på sidan 61 och följ instruktionerna för felsökning.

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Fel med rapportgenerering eller allmänt instrumentfel (nätverksfel, fel vid laddning/urladdning av reagenser osv.).	Programvaru- eller instrumentfel.	Se <i>Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> , <i>arbetsflödesguide</i> (dokumentnr 200080937) för hjälp med rapportgenerering. Kontakta Illumina teknisk support för att få ytterligare hjälp.
DNA-biblioteket blir inte godkänt i kvalitetskontrollen.	Provkraven uppfylldes inte.	Säkerställ att lämpliga prover används och upprepa biblioteksberedningen från steget Fragmentera gDNA. Se Provkrav på sidan 22 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 22 .
	Användnings- eller utrustningsfel i analysarbetsflödet.	Upprepa biblioteksberedningen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illumina teknisk support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod. - Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 61. - Starta biblioteksberedningen från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 37.

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
DNA-biblioteket blir inte godkänt i kvalitetskontrollen (fortsättning).	Kriterierna CONTAMINATION_SCORE uppfylls inte.	Mer information om att undvika korskontaminering finns i avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder. Granska plattlayouten och biblioteksindexeringen för att säkerställa att prover med samma index inte sekvenserades tillsammans. Starta biblioteksberedningen av påverkade prover från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 37 . Kontaminering kan ha uppstått vid provextrahering. Det kan vara nödvändigt att upprepa extraktionen för att säkerställa att provet inte är kontaminerat.
	Provet kan vara för fragmenterat eller ha nukleinsyreskador som påverkar förmågan att generera tillräckligt med unika bibliotek.	Följ Konfigurationsinställningar för ultrasonikator för DNA-fragmentering på sidan 20 och ultrasonikatortillverkarens inställningar för användning och drift (inklusive vattennivå och rörtyp). Säkerställ att rätt prover används i analysen. Se Provkrav på sidan 22 och Extrahering, kvantifiering och förvaring av nukleinsyra på sidan 22 . Det kan vara nödvändigt att utföra en ny provextrahering och/eller upprepa steget Fragmentera gDNA om provet är för fragmenterat eller skadat.
	- Fel vid poolning. - Fel vid spädning. - Ofullständig värmedenaturering av PDL/PHL.	Uteslut DNA-relaterade orsaker som anges ovan (t.ex. provinmatning, provkvalitet, utrustning). Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 61 .

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
DNA-biblioteket blir inte godkänt i kvalitetskontrollen (fortsättning).	Kulbaserad normalisering (låg klusterdensitet).	Om ingen av de andra möjliga orsakerna till biblioteks kvalitetskontrollfel misstänks kan koncentrationen av kulor från LNB1-reagensröret ha orsakat låg klusterdensitet på grund av otillräcklig blandning. Hitta och registrera klusterdensitetsvärdet från <code>RunCompletionStatus.xml</code> i körningsmappen. Om klusterdensiteten är under 170 K/mm ² och en systemisk kulbaserad normalisering misstänks (inklusive bevis från totala PF-avläsningar för de positiva kontrollerna), ska biblioteken från PCR-plattan normaliserade bibliotek (NL) resekvenseras och instruktionerna för en justerad andra spädning följas. Se Beredning för sekvensering på sidan 61 och Felsökningsarbetsflöde: Beredning av den andra spädningen på sidan 64 .
	Fel i arbetsflödet för biblioteksberedning under eller före index-PCR-steget.	Starta biblioteksberedningen från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 37 .
	- Felaktig användning av anrikningsprober. - Fel i arbetsflödet för biblioteksberedning under eller efter det första hybridiseringssteget.	Ett systemiskt probpoolfel (t.ex. byte av probpooler) kan resultera i normala totala godkända filteravläsningar, men medianexontäckning misslyckas med QC. Starta biblioteksberedningen från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 37 .

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Fel med positiv kontroll.	Provkraven för den positiva kontrollen uppfylldes inte.	Säkerställ att rätt prover används i analysen. Granska plattlayouten och säkerställ att rätt reagenser (prober, index) är i rätt brunnar. Kontrollera att det positiva kontrollprovet förvaras i enlighet med märkningen. Upprepa biblioteksberedningen för alla prover som delar den positiva kontrollen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illumina teknisk support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod. - Omsekvensera bibliotek från PCR-plattan NL (normaliserade bibliotek). Se Beredning för sekvensering på sidan 61. - Starta biblioteksberedningen från arbetsflödets början. Se Fragmentera gDNA på sidan 37.
	Användnings- eller utrustningsfel i analysarbetsflödet.	
NTC-fel.	Korskontaminering uppstod eller kontaminering av arbetsområdet.	Mer information om att dekontaminera arbetsområden och undvika korskontaminering finns i avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder. Granska plattlayouten och biblioteksindexeringen för att säkerställa att prover med samma index inte sekvenserades tillsammans. Upprepa biblioteksberedningen från arbetsflödets början för alla bibliotek som delar kontroll utan mall.
	Felaktig indexering av bibliotek.	

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Positiva och/eller negativa kontroller i sekvenseringskörningen analyserades som icke-kontrollprover.	Felaktig tilldelning av provtyp under inställning av sekvenseringskörning.	Upprepa analys med kontroller korrekt identifierade enligt instruktionerna i Arbetsflödesguiden för analysmodul (se <i>Analysmodulen Illumina Connected Run TruSight Oncology Comprehensive HRD (EU, DRAGEN)</i> , arbetsflödesguide (dokumentnr 200080937)).

Prestandaegenskaper

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) är en analys som möjliggör bedömning av HRD med DNA extraherat från FFPE-tumörvävnadsprover från äggstockscancerpatienter. Den använder två NGS-paneler. En panel används för detektion av skadliga och misstänkta skadliga förändringar i BRCA1- och BRCA2-gener, inklusive små DNA-varianter och stora omstruktureringar. En andra NGS-panel används för att mäta genominstabilitet som rapporteras som en GIS. BRCA-positiv definieras som detektion av en skadlig eller misstänkt skadlig ändring i antingen BRCA1- eller BRCA2-gener. GIS-positiv definieras som GIS $\geq$ 42. HRD-positiv definieras som BRCA-positiv och/eller GIS-positiv.

FFPE-prover med specifika CDx-positiva varianter inkluderades i studierna.

Tvåsidiga 95 % konfidensintervall (KI) beräknat med Wilson Score-metoden, om inget annat anges.

[Tabell 38](#) visar definitioner av mått beräknade i olika studier.

Tabell 38 Definitioner av mått

Term	Benämning
Positiv procentuell överensstämmelse (PPA)	Procentandelen positiva resultat för jämförelsemetoden i vilka TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) är positiva.
Negativ procentuell överensstämmelse (NPA)	Procentandelen negativa resultat för jämförelsemetoden i vilka TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) är negativa.
Positiva bestämningar i procent (PPC)	Procentandelen observationer som är positiva för ett mål bland observationer som förväntas vara positiva för målet.
Negativa bestämningar i procent (PNC)	Procentandelen observationer som är negativa för ett mål bland observationer som förväntas vara negativa för målet.
n/N	Antalet positiva eller negativa observationer (n), dividerat med det totala antalet observationer (N) för att beräkna PPC respektive PNC. Värdena för n och N kan vara på olika nivåer (t.ex. variant eller gen) eller kombineras över en grupp (t.ex. SNV).
Standardavvikelse (SD)	Ett mått på variationen av värdena för en variabel om dess medelvärde.
Variationskoefficient i procent (%CV)	Standardavvikelse dividerad med medelvärdet i procent.

Noggrannhet

Noggrannheten hos TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen för att detektera HRD hos patienter med äggstockscancer demonstrerades genom att bedöma överensstämmelsen mellan HRD-status, GIS-status och BRCA-statusresultat mellan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen och en validerad NGS-baserad jämförelseanalys. Noggrannheten uppskattades i förhållande till den ortogonala metoden; PPA, NPA och det associerade tvåsidiga Wilson Score KI 95 % beräknades.

175 FFPE-DNA-prover från äggstockscancer analyserades med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen och den ortogonala metoden. Ett prov hade ogiltiga TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultat och ett annat prov hade ogiltiga komparatoranalysresultat. Den utvärderbara datauppsättningen för GIS- och HRD-status var 173 prover. Den utvärderbara datauppsättningen för BRCA-status var 169 på grund av uteslutning av fyra ytterligare prover med BRCA-varianter utanför TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens mätintervall. Överensstämmelseanalyserna baserade på giltiga testresultat visas i [Tabell 39](#), [Tabell 40](#) och [Tabell 41](#).

Tabell 39 Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen och jämförelsemetoden för detektion av HRD-status

		Resultat för jämförelsemetod		
		HRD-positiv	HRD-negativ	Totalt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) analysresultat	HRD-positiv	97	6	103
	HRD-negativ	6	64	70
	Totalt	103	70	173
Statistik för överensstämmelse	PPA % (n/N; 95 % KI)	94,2 % (97/103; 87,9 %, 97,3 %)		
	NPA % (n/N; 95 % KI)	91,4 % (64/70; 82,5 %, 96,0 %)		

Tabell 40 Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen och jämförelsemetoden för detektion av GIS-status

		Resultat för jämförelsemetod		
		Positiva för GIS	Negativa för GIS	Totalt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) analysresultat	Positiva för GIS	95	3	98
	Negativa för GIS	6	69	75
	Totalt	101	72	173
Statistik för överensstämmelse	PPA % (n/N; 95 % KI)	94,1 % (95/101; 87,6 %, 97,2 %)		
	NPA % (n/N; 95 % KI)	95,8 % (69/72; 88,5 %, 98,6 %)		

Tabell 41 Överensstämmelse mellan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen och jämförelsemetoden för detektion av BRCA-status

		Resultat för jämförelsemetod		
		Positiv för BRCA	Negativ för BRCA	Totalt
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) analysresultat	Positiv för BRCA	40	8	48
	Negativ för BRCA	2	119	121
	Totalt	42	127	169
Statistik för överensstämmelse	PPA % (n/N; 95 % KI)	95,2 % (40/42; 84,2 %, 98,7 %)		
	NPA % (n/N; 95 % KI)	93,7 % (119/127; 88,1 %, 96,8 %)		

Reproducerbarhet

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens reproducerbarhet och repeterbarhet utvärderades över tre externa testplatser med två operatörer per plats, två replikat inom körning, tre loter och tre icke på varandra följande dagar. På var och en av de tre platserna utförde två operatörer oberoende tester på separata NextSeq 550Dx-instrument. Testningen utfördes med en reproducerbarhetspanel på 27 prover som innehöll DNA extraherat från FFPE-vävnadsprover från äggstockar med kända BRCA1- och BRCA2-mutationer och/eller GIS.

Av de 27 panelproverna riktades 16 mot små DNA-varianter i BRCA-generna, inklusive: SNV:er, varianter i homopolymerregioner ≥ 5 bp, insertioner och deletioner < 10 bp och insertioner och deletioner ≥ 10 bp. För BRCA LR-varianttypen användes två panelprover för BRCA LR-varianter < 3 exoner och ett panelprov för BRCA LR-varianter ≥ 3 exoner. För GIS representerade tre panelprover hög GIS (+)-status, tre panelprover representerade GIS (-), två panelprover representerade låg GIS (+), och ett av panelproverna som redan representerade LR-variantnivån < 3 exoner representerade även ett låg GIS (+)-prov. Vid varje laboratorium analyserade varje operatör panelproverna under tre icke-konsekutiva dagar, vilket genererade sex observationer per mål och panelprov. Från samtliga tre laboratorier genererades 36 observationer per panelprov (tre laboratorier $\times$ två operatörer/instrument $\times$ tre dagar $\times$ två replikat inom samma körning).

PPC och PNC fastställdes för de riktade panelproverna. Analyser utfördes för att uppskatta PPC och PNC (med associerade 95 % KI) genom att kombinera resultaten från sex operatörer på tre platser. För varje riktad liten DNA-variant och LR-variant kombinerades TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysobservationer från panelprover som förväntades vara negativa för den riktade varianten för att beräkna PNC. TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysobservationer från GIS (-)-panelprover kombinerades för att beräkna PNC för GIS (-)-panelprover.

Små DNA-varianter i BRCA

PPC-värden för både hög nivå (2–3 $\times$ C95) och låg nivå (1–1,5 $\times$ C95) i BRCA-panelen för små DNA-varianter var 100 % (Tabell 42). PNC-värden för BRCA-panelen för små DNA-varianter var också 100 % (Tabell 43).

Tabell 42 PPC för riktade små DNA-varianter i BRCA per variantnivå och variantklass

Variantnivå	Variantklass	Riktad variant	Genomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N)	95 % KI
Hög	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)
	Insertion eller deletion (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0,166	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.153	100 (36/36)	(90,4, 100)
	Insertion eller deletion (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.189	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0.141	100 (33/33)	(89,6, 100)
	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)
Låg	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)
	Insertion eller deletion (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	0.121	100 (36/36)	(90,4, 100)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	0.122	100 (35/35)	(90,1, 100)
	Insertion eller deletion (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	0.109	100 (35/35)	(90,1, 100)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	0,111	100 (36/36)	(90,4, 100)

Tabell 43 PNC för riktade små DNA-varianter i BRCA per variantklass

Variantklass	Riktad variant	PNC (%) (n/N)	95 % KI
SNV	BRCA1 p.(A1708E)	100 (585/585)	(99,3, 100)
	BRCA1 c.80+1G>A	100 (557/557)	(99,3, 100)
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)
Insertion eller deletion (< 10 bp)	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	100 (627/627)	(99,4, 100)
	BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	100 (632/632)	(99,4, 100)

Variantklass	Riktad variant	PNC (%) (n/N)	95 % KI
Insertion eller deletion (≥ 10 bp)	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	100 (584/584)	(99,3, 100)
	BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	100 (634/634)	(99,4, 100)

Tabell 44 visar varianskomponentanalysen efter variationskälla för höga och låga nivåer för varje liten BRCA DNA-variantklass. Medelvärde för VAF för de små BRCA DNA-varianterna med hög nivå varierade från 0,121 till 0,248 och de små BRCA DNA-varianterna med låg nivå varierade från 0,087 till 0,147. Total SD för de små BRCA DNA-varianterna varierade från 0,019 (11,4 % CV) till 0,041 (28,7 % CV) för små BRCA DNA-varianterna med hög nivå och från 0,016 (18,9 % CV) till 0,043 (30,1 % CV) för små BRCA DNA-varianterna med låg nivå.

Tabell 44 Varianskomponentanalys av VAF för riktade små BRCA DNA-varianterna

Variantnivå	Variantklass	Riktad variant	N	Genomsnittlig VAF	SD (%CV) per plats	Användarens/instrumentets SD (%CV)	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per lot	Repetierbarhet SD (%CV)	Total SD (%CV)
Hög	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)
	Varianter i homopolymer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	34	0.248	0,000 (0,0)	0,011 (4,3)	0,008 (3,3)	0,000 (0,0)	0,025 (10,1)	0,029 (11,5)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.239	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,000 (0,0)	0,041 (17,0)	0,041 (17,1)
	Insertion eller deletion < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.166	0,006 (3,7)	0,005 (3,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,3)	0,019 (11,4)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	36	0.153	0,008 (5,1)	0,000 (0,0)	0,013 (8,5)	0,000 (0,0)	0,020 (12,9)	0,025 (16,3)
	Insertion eller deletion ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	36	0.189	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,006 (3,3)	0,015 (8,0)	0,033 (17,5)	0,037 (19,6)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	33	0.141	0,000 (0,0)	0,013 (9,5)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,038 (27,1)	0,041 (28,7)
	SNV	BRCA1 p.(A1708E)	36	0.087	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,016 (18,7)	0,016 (18,9)
		BRCA1 c.80+1G>A	36	0.087	0,003 (3,7)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (22,0)	0,019 (22,3)
Låg	Varianter i homopolymer ≥ 5 bp	BRCA2 p.(E2981Rfs*37)	36	0.147	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,021 (14,0)	0,021 (14,1)
		BRCA1 p.(R1726Kfs*3)	36	0.142	0,011 (8,0)	0,000 (0,0)	0,010 (7,2)	0,015 (10,7)	0,037 (26,0)	0,043 (30,1)
	Insertion eller deletion < 10 bp	BRCA1 p.(A1279Hfs*28)	36	0.121	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (3,7)	0,017 (14,0)	0,017 (14,5)
		BRCA1 p.(Q1756Pfs*74)	35	0.122	0,004 (3,4)	0,007 (5,6)	0,000 (0,0)	0,006 (5,0)	0,021 (16,9)	0,023 (18,8)
	Insertion eller deletion ≥ 10 bp	BRCA1 p.(C994Sfs*7)	35	0.109	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (6,5)	0,006 (5,5)	0,026 (24,3)	0,028 (25,8)
		BRCA2 p.(E1811Kfs*3)	36	0.111	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,000 (0,0)	0,006 (5,7)	0,029 (26,0)	0,030 (27,2)

Stora omstruktureringsvarianter i BRCA

PPC-värden för riktade BRCA-LR:er var 100 % (29/29) för BRCA2 LR $\geq$ 3 exoner, 97,2 % (35/36) för BRCA2 LR < 3 exoner och 94,3 % (33/35) för BRCA1 LR < 3 exoner ([Tabell 45](#)). PNC-värden för riktade BRCA-LR:er var 98,9 % (630/637) för BRCA1 och 100 % (607/607) för BRCA2 ([Tabell 46](#)).

Tabell 45 PPC för riktade BRCA LR:er efter variantklass

Variantklass	Riktad variant	Genomsnittlig VAF	PPC (%) (n/N)	95 % KI*
LR $\geq$ 3 exoner	BRCA2 LOSS	0.448	100 (29/29)	(88,3, 100)
LR < 3 exoner	BRCA2 LOSS	0.602	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	BRCA1 LOSS	0.680	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)

Tabell 46 PNC för riktade BRCA LR:er

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

[Tabell 47](#) visar varianskomponentanalysen efter variationskälla för varje BRCA LR-klass. Genomsnittlig VAF för LR $\geq$ 3 exonvarianten var 0,448 med en total SD på 0,026 (5,7 % CV). Genomsnittlig VAF för LR < 3 exonvarianter varierade från 0,602 till 0,680 och total SD varierade från 0,038 (6,3 % CV) till 0,079 (11,6 % CV).

Tabell 47 Varianskomponentanalys av VAF i riktade BRCA-LR:er

Variantklass	Riktad variant	N	Genomsnittlig VAF	SD (%CV) per plats	Operatör/ Instrument SD (%CV)	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per lot	Repeterbarhet SD (%CV)	Total SD (%CV)
LR $\geq$ 3 exoner	BRCA2 LOSS	29	0.448	0,000 (0,0)	0,005 (1,1)	0,013 (2,9)	0,000 (0,0)	0,022 (4,8)	0,026 (5,7)
LR < 3 exoner	BRCA2 LOSS	36	0.602	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,015 (2,5)	0,000 (0,0)	0,035 (5,8)	0,038 (6,3)
	BRCA1 LOSS	35	0.680	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,048 (7,1)	0,000 (0,0)	0,062 (9,2)	0,079 (11,6)

Genomisk instabilitetspoäng (GIS)

PPC-värdena var 100 % för panelprover med hög GIS (+). Panelprover med låg GIS (+) hade PPC-värden från 94,4 % till 100 % ([Tabell 48](#)). PNC-värden var 100 % för alla GIS (-)-panelprover ([Tabell 49](#)).

Tabell 48 PPC för GIS efter riktad GIS-status och panelprov

Riktad GIS-status	Riktad GIS	Genomsnittlig GIS	PPC (%) (n/N)	95 % KI*
Hög 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)

Riktad GIS-status	Riktad GIS	Genomsnittlig GIS	PPC (%) (n/N)	95 % KI*
Låg 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 för GIS-negativa riktade panelprover

Riktad GIS-status	Riktad GIS	Genomsnittlig GIS	PNC (%) (n/N)	95 % KI*
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 visar varianskomponentanalysen efter variationskälla för varje riktat panelprov med hög GIS (+), låg GIS (+) och GIS (-). Medelvärde av GIS i de riktade GIS-panelproverna varierade från 60,1 till 70,2 för hög GIS (+), från 46,3 till 53,1 för låg GIS (+) och från 18,2 till 23,3 för GIS (-). Den totala SD över de riktade GIS-panelproverna varierade från 2,5 (3,5 % CV) till 3,2 (5,2 % CV) för hög GIS (+), från 1,5 (2,9 % CV) till 3,8 (7,2 % CV) för låg GIS (+) och från 2,5 (11,7 % CV) till 3,3 (14,1 % CV) för GIS (-)-panelprover.

Tabell 50 Varianskomponentanalys av GIS i de riktade panelproverna

Riktad GIS-status	Riktad GIS	N	Genomsnittlig GIS	SD (%CV) per plats	Operatör/ Instrument SD (%CV)	SD (%CV) per dag	SD (%CV) per lot	Repeterbarhet SD (%CV)	Total SD (%CV)
Hög 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)
Låg 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)

Gräns för blankprov

Procentandelen falskt positiva (av de totala förväntade negativa) bedömdes genom replikattestning av FFPE-benign intilliggande äggstocksvävnad. Vävnaden förväntades vara GIS-negativ och inte innehålla skadliga eller misstänkta skadliga BRCA1- och BRCA2-mutationer (små DNA-varianter och LR:er). Sju godartade FFPE-DNA-prover från äggstockar kördes i duplikat med två operatörer under tre dagar för varje av de två reagensloterna i 8-plexformat. En del av proverna poolades om och sekvenserades om i ett 3-plexformat för att utvärdera falskt positiva resultat i flera multiplexkonfigurationer som stöds av denna produkt. Totalt fanns det 168 möjliga

observationer. Andelen falskt positiva resultat beräknades på positionsnivå för små BRCA-DNA-varianter (cirka 3 miljoner positioner), på gennivå för BRCA-LR:er och på provnivå för GIS. Procentandelen falskt positiva per varianttyp visas i [Tabell 51](#).

Tabell 51 Falskt positiva enligt varianttyp

Varianttyp	Falskt positiva*
Små BRCA DNA-varianter	0 % (0/3,076,657)
BRCA LR	0 % (0/384)
GIS	0 % (0/192)

* Nämnarna är totalt 8-plex och 3-plex körningar.

Detekteringsgräns

Detektionsgränsen (LoD) för små BRCA-DNA-varianter (SNV:er, insertioner eller deletioner ≥ 10 bp, insertioner eller deletioner < 10 bp, varianter i homopolymerregioner ≥ 5 bp), BRCA-LR:er < 3 exoner och ≥ 3 exoner och GIS fastställdes i FFPE DNA-prover från cancer. LoD är det lägsta analysvärdet som kan detekteras konsekvent (95 % träffsäkerhet eller ett typ II-fel på 5 %). LoD för GIS definierades som det lägsta tumörinnehållet som uppnår ≥ 95 % GIS-detektion och för små BRCA DNA-varianter och LR:er som variantallefrekvens (VAF). FFPE DNA-prover från äggstockscancer användes för små BRCA DNA-varianter, GIS och BRCA LR ≥ 3 exoner. Ett FFPE-DNA-prov från bröstcancer användes för BRCA LR < 3 exoner på grund av brist på tillgänglig FFPE-vävnad från äggstockscancer. Prover späddes till flera testnivåer, med 12 observationer för varje testnivå per reagenslot per variant, genererade av flera operatörer under tre dagar utan på varandra följande användning med två reagensloter. Den högsta LoD för de två reagensloterna användes som detektionsgräns för varianten ([Tabell 52](#)).

Tabell 52 Detektionsgräns för BRCA små DNA-varianter, BRCA LR:er, GIS

Varianttyp	Variantklass	C95
Små BRCA DNA-varianter	SNV	0,05 VAF
	Insertioner eller deletioner ≥ 10 bp	0,06 VAF
	Insertioner eller deletioner < 10 bp	0,07 VAF
	Varianter i homopolymer region ≥ 5 bp	0,07 VAF
Stora BRCA-omstruktureringar	LR < 3 exoner	0,61 VAF
	LR ≥ 3 exoner	0,46 VAF
GIS	GIS	33 % tumörinnehåll

Interfererande substanser

Effekten av potentiella endogena och exogena substanser på TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysens prestanda utvärderades genom att den endogena substansen hemoglobin tillsattes i prover under nukleinsyraextraktionsprocessen, samt genom att exogena substanser (etanol, proteinas K, tvättbuffert, paraffin, xylol och överskottsindexprimrar) tillsattes i den renade nukleinsyran före biblioteksberedning. Fyra replikat av provbiblioteken genererades av en eller flera operatörer. För alla substanser användes 10 FFPE-prover från äggstockscancer för analys av små BRCA-DNA-varianter, BRCA-LR:er och GIS. Effekten av nekros utvärderades också på en annan uppsättning av tre FFPE-prover från äggstockscancer med en rad nekrotisk vävnad (10 %–20 %). En makrodissekerad kontroll utan nekros inkluderades för varje nekrosprov. Fyra replikat av DNA-bibliotek och deras kontroller bearbetades tillsammans. För alla interferenser jämfördes provreplikater per substans med deras respektive kontrollreplikater. Hemoglobin (4 mg/ml), etanol (5 %), proteinas K (2x av representativ koncentration av extraktionsmetod), tvättbuffert (2,5 %), paraffin (25 % av homogeniserad smält vävnad), xylol (0,0001 %), indexprimrar (30 % överskott) interfererar inte med detektionen av små BRCA-DNA-varianter, BRCA LR:er och GIS. VAF-nivåer för små BRCA-DNA-varianter och GIS påverkades inte av förekomsten av några av de testade interferenserna. Närvaron av nekrotisk vävnad upp till 20 % störde inte små BRCA-DNA-varianter och GIS. BRCA LR:er utvärderades inte för nekros på grund av otillgängligheten av ett FFPE-prov från nekrotisk äggstockscancer som innehöll en BRCA LR-variant.

Tröskelvärde vid titrering av nukleinsyra

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) kräver en fast inmatning på 40 ng DNA-prov. Analysens prestanda utvärderades med nio DNA-prover extraherade från FFPE-vävnad från äggstockar för att fastställa toleranser för inmatningsvariation av nukleinsyra som kan leda till misslyckad analys eller negativ inverkan på analysens resultat. Varje FFPE-prov innehöll en eller flera små BRCA DNA-varianter, BRCA-LR:er eller GIS och testades vid fem inmatningsnivåer (20 ng, 30 ng, 40 ng [nominellt], 60 ng och 100 ng) i triplikat. Resultaten visade att detektion av små BRCA DNA-varianter, BRCA LR-bestämning och GIS-status inte påverkades av skillnader i inmatningsmängd.

Resultaten visade också att nukleinsyrainmatningar två gånger under det nominella tillståndet hade ett ökat antal kvalitetskontrollfel vilket ledde till färre prover som utvärderades för variantbestämning. Vid inmatningsnivån på 20 ng erhöles en biblioteksgiltighet på 55,5 % på grund av fel i procentuell exontäckning vid 50X (PCT_EXON_50X) och medianexontäckning (MEDIAN_EXON_COVERAGE). BRCA liten DNA-variant VAF och GIS påverkades inte vid inmatningsnivåer på 20 ng.

Korskontaminering

Studien av korskontaminering utfördes för att utvärdera om falskt positiva resultat orsakades av kontaminering mellan brunnar under provbiblioteksberedning eller kontaminering mellan på varandra följande sekvenseringskörningar. Analys utfördes för små BRCA DNA-varianter, BRCA-LR:er och GIS. Bibliotek beredd utifrån kartlagda FFPE-vävnadsprover från äggstockscancer i ett ruttmönster med alternerande prover för att utvärdera kontaminering mellan brunnar samt med alternerande index för att utvärdera kontaminering mellan

sekvenseringskörningar när de sekvenseras efter varandra på samma NextSeq 550Dx-instrument. Korskontaminationsstudien visade en kontamineringsgrad på 0,8 % (2/252 kontaminationshändelser), observerad genom att undersöka de detekterade varianterna i varje prov. Inga kontamineringshändelser hittades genom att analysera mottagarbibliotek baserat på variantbestämning för små BRCA-DNA-varianter och BRCA LR. De två observerade kontamineringshändelserna var falskt positiva för GIS i GIS-mottagarprover på grund av inneboende GIS-variation och GIS för dessa två prover var nära beslutströskeln.

Studien visade att TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen förväntas ha en låg förekomst av korskontaminering från brunn till brunn eller från körning till körning. Dessa resultat, tillsammans med kontamineringsmått i programvaran, minskar risken för falska variantresultat på grund av provkontaminering.

Utvärdering av extraktionssatser för nukleinsyra

Tre kommersiellt tillgängliga DNA-extraktionssatser utvärderades med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN). De tre extraktionssatserna skilde sig åt gällande användning av avparaffiniseringsmedel och bindningssteget för nukleinsyra (Tabell 53). Sats 3 var den dominerande extraktionssatsen som användes för att bestämma prestanda för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Fem FFPE-prover från äggstockar utsattes för nukleinsyreextraktion (tre satser x två operatörer x tre dagar x två replikat) för att erhålla DNA (36 totala observationer). Kvalitativ analys visade att det inte fanns någon märkbar skillnad i variantbestämning för någon av varianttyperna (BRCA små DNA-varianter, BRCA LR:er, GIS), eftersom alla variantobservationer hade PPC-värden > 97 %. Kvantitativ analys visade ingen signifikant satsrelaterad skillnad i VAF och GIS för små BRCA-DNA-varianter.

Tabell 53 Satsegenskaper

Sats	Satsnamn	Avparaffiniseringsmedel	Bindning av nukleinsyra
1	Qiagen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue	Xylen	Kolumner
2	Beckman Coulter FormaPure XL DNA	Mineralolja	Magnetkolor
3	Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE	Patentskyddad avparaffineringslösning	Kolumner

Reagensstabilitet

Stabilitet i realtid

Realtidsstabilitet utvärderades med sex FFPE-vävnadsprover från äggstockscancer. Tre reagensloter testades vid sex olika tidpunkter med liknande intervall (3 månader, 6 månader, 9 månader, 13 månader, 19 månader och 25 månader). Två operatörer utförde biblioteksberedning för varje lot, inklusive tre replikat av varje prov, för totalt sex replikat per lot. För riktade små BRCA DNA-varianter var aggregerad PPC 100 %, för riktad BRCA LR-aggregerad PPC ≥ 92 % och för GIS-aggregerad PPC ≥ 83 %. Dessutom observerades inga signifikanta skillnader över tid för GIS eller VAF för små BRCA DNA-varianter.

Satsstabilitet vid användning

TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analyssatsens stabilitet under användning av sats utvärderades vid standardförhållanden och vid olika tillfällen under hållbarhetstiden för att se om det fanns stöd för flera användningar av satsen. Reagenssatsens frysta komponenter utsattes för flera frysnings-/upptiningscykler och de kylda reagenserna fick uppnå rumstemperatur och testades för att verifiera stöd för upp till fyra användningar av satsen. Alla kriterier i kvalitetskontrollen uppfylldes för alla frysnings-/upptiningscykler vid alla tidpunkter som testades. Variantbestämning utvärderades för små BRCA-DNA-varianter, BRCA-LR:er och GIS. Resultaten stöder upp till fyra frysnings-/upptiningscykler av satsen. Dessutom användes en reagenssats för att bereda totalt 24 DNA-prover av en operatör som visade att det finns tillräcklig reagensvolym för 24 DNA- och 24 HRD-bibliotek.

Transportstabilitet

Satstransportstabiliteten för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen utvärderades med nio FFPE-prover från äggstockscancer för att visa TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-reagenssatsernas funktionalitet efter exponering för simulerade distributionsförhållanden. Åtta FFPE-prover från äggstockscancer användes för att visa funktionalitet efter reagenssatsernas exponering för simulerade internationella sommar- och vintertemperaturprofiler. Funktionell testning utfördes efter exponering med ovannämnda prover och bestod av sex till 12 replikat av varje prov per förhållande. De fysiska attributen för satserna observerades också och visade sig bibehållas efter distribution för alla testfall. Funktionell testning gav slutsatsen att transport inte påverkade variantbestämningen negativt för små BRCA-DNA-varianter (PPC $\geq$ 96 %), BRCA LR:er (PPC $\geq$ 94 %) och GIS (PPC = 100 %), i förhållande till kontrollförhållandet.

Provstabilitet

Stabilitet hos nukleinsyra

Stabiliteten hos nukleinsyror (DNA) och tillhörande kvantifiering för användning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen utvärderades med hjälp av FFPE-vävnadsprover från äggstockscancer. FFPE-block sektionerades och DNA extraherades. Extraherad nukleinsyra blandades noggrant, kvantifierades, kontrollerades med avseende på nukleinsyrakvalitet och alikvoterades i två uppsättningar med engångsrör som skulle frysas vid två tidpunkter: T0 (kontroll) och T1 (för att verifiera stöd för 28 dagar). Allt extraherat DNA förvarades vid -25 °C till -15 °C tills det testades vid T0 eller T1 med flera replikat och operatörer. T1 jämfördes med T0 för små BRCA DNA-varianter, BRCA-LR:er och GIS. Data indikerar att nukleinsyror och deras associerade kvantifiering för användning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen är stabila i upp till 28 dagar vid förvaring vid rekommenderade temperaturer (-25 °C till -15 °C).

Biblioteksstabilitet

Stabiliteten hos bibliotek som använde var och en av de fem säkra stoppunkterna för analysen (se [Tabell 54](#)) utvärderades med hjälp av flera FFPE-vävnadsprover från äggstockscancer och ett FFPE-vävnadsprov från bröstcancer. Kontrollbibliotek (T0, inga stoppunkter) sekvenserades omedelbart i slutet av arbetsflödet.

Alikvoter från samma bibliotek hölls vid stoppunkterna vid -25 °C till -15 °C under tiden (T1), för att stödja de dagar som anges i [Tabell 54](#). T1 jämfördes med T0 för små BRCA DNA-varianter, BRCA-LR:er och GIS. Data indikerar att bibliotek, som genereras från TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen, är stabila i enlighet med bruksanvisningen.

Tabell 54 Förvaringstider för bibliotek

Biblioteks typ	Platta	Antal dagar
Fragmenterat gDNA	LP PCR	≤ 7
Före anrikning	ALS PCR	≤ 30
Efter anrikning	ELU2 PCR	≤ 7
PCR efter anrikning	PL PCR	≤ 30
Normaliserad	NL PCR	≤ 32

Stabilitet hos FFPE-vävnad fäst på objektglas

Stabiliteten hos FFPE-vävnader fästa på objektglas för användning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen, utvärderades genom att FFPE-block (5 µm sektioner) från tio FFPE-vävnadsprover från äggstockscancer, som fästes på objektglas och därefter förvarades vid rumstemperatur (22 °C) vid två tidpunkter: T0 (kontroll) och T1 (för att verifiera stöd för 28 dagar). Nukleinsyramaterialet kvantifierades och bearbetades sedan genom TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen inom 24 timmar för varje tidpunkt. Vid varje tidpunkt testades flera replikat per prov av flera operatörer. T1 jämfördes med T0 för små BRCA DNA-varianter, BRCA-LR:er och GIS. Variantbestämning utvärderades. Data indikerar att FFPE-vävnad som fästs på objektglas för användning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) är stabil vid rumstemperatur i upp till 28 dagar.

Klinisk prestandaöverbrygningsstudie för HRD

För att validera TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen som en CDx för val av patienter med äggstockscancer för behandling med LYNPARZA (olaparib), testades restprover från patienter som rekryterats till den kliniska studien PAOLA-1 (NCT02477644) för att stödja en klinisk överbrygningsstudie.

Studien utfördes för att bedöma överensstämmelsen mellan HRD-status mellan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen och den kliniska provningsanalysen (CTA) som används i PAOLA-1 och för att bedöma den kliniska effekten av olaparib hos de HRD-positiva patienter som identifierats av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-analysen. PAOLA-1 var en multicenter, fas III, randomiserad, dubbelblindad, placebokontrollerad studie som undersökte den kliniska effekten av olaparib plus bevacizumab som en förstahands underhållsbehandling för patienter med avancerad äggstockscancer. Patienternas HRD-status fastställdes efter randomiseringen före den primära analysen med hjälp av CTA. Det primära effektmåttet var progressionsfri överlevnad (PFS), definierad som tiden från randomisering till progression fastställd av prövarens bedömning med modifierad RECIST 1.1 eller dödsfall. Av de 806 patienter som randomiserades i PAOLA-1-studien var 399 restprover tillgängliga för testning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN).

Demografin för patienter med tillgängliga TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultat liknade dem i PAOLA-1-studien. På samma sätt var deltagarnas egenskaper i allmänhet likartade mellan de som var HRD-positiva TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) med jämfört med de som var HRD-positiva av CTA.

Konkordansresultat

Av de 399 prover som var tillgängliga för testning med TSO Comprehensive HRD (DRAGEN), gav 382 ett utvärderingsbart resultat. De 17 icke-utvärderbara proverna gav inget resultat på grund av fel i antingen testkvalitetskontroll (N=12) eller patologisk granskning (N=5) (analys ogiltig frekvens på 3 % [12/394]). Totalt 365 registrerade patienter hade prover med både utvärderingsbar CTA och TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultat. Överensstämmelse av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)-resultat i förhållande till CTA-resultat bland prover med giltiga resultat visas i [Tabell 55](#).

Tabell 55 Konkordans mellan TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) och CTA för detektion av HRD

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

* KI baserat på exakt binomial metod (Clopper and Pearson, 1934).

Kliniska effektivitetsresultat

Den kliniska prestandan för TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) fastställdes genom bestämning av klinisk effekt i den HRD-positiva populationen. PFS-riskkvoter (HR) för behandlingsgrupperna med olaparib jämfört med placebo beräknades med en ojusterad Cox-proportionell riskmodell. [Tabell 56](#) visar PFS-riskkvoterna i CTA- och TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positiva deltagare. [Figur 4](#) visar Kaplan-Meier-kurvorna för PFS hos TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) positiva deltagare. I CTA- och TSO Comprehensive HRD (DRAGEN) HRD-positiva populationer var PFS-riskkvoten 0,33 (95 % KI: 0,25, 0,45) respektive 0,32 (95 % KI: 0,22, 0,48) och representerade en 67 % respektive 68 % minskning av risken för progression eller dödsfall för deltagare i olaparib plus bevacizumab-gruppen jämfört med placebo plus bevacizumab-gruppen. En känslighetsanalys som utvärderade effektiviteten av imputerade saknade CDx-resultat visade att riskkvoterna för PFS i de imputerade HRD-positiva populationerna var i linje med skattningarna i den primära analysen.

Tabell 56 Klinisk effekt i CTA och 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 % KI) ³	0,33 (0,25, 0,45)	
TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)	N	149	71
	PFS ¹ (95 % KI) ²	NR ⁴ (37,2, NR ⁴)	17,4 (14,7, 22,1)
	PFS HR (95 % KI) ³	0,32 (0,22, 0,48)	

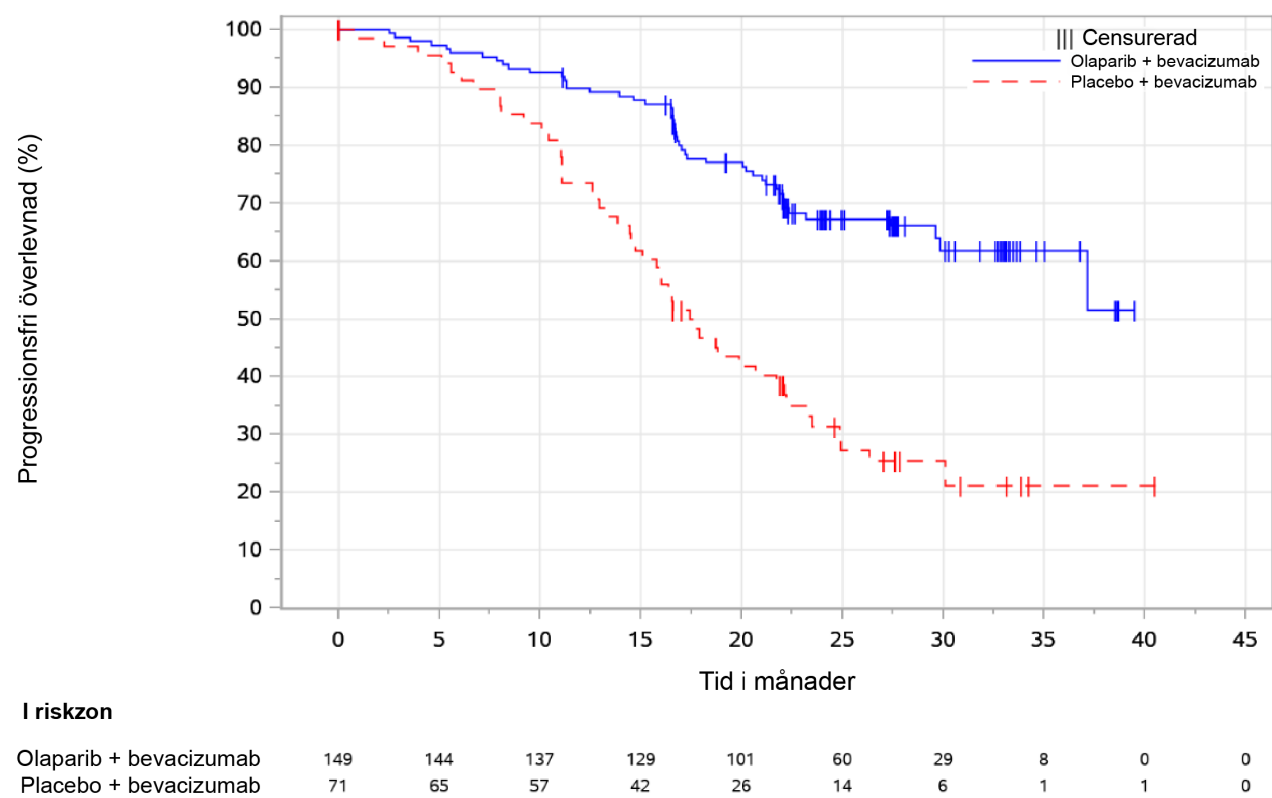
¹ PFS-median i månader.

² Från produktgränsmetoden (Kaplan-Meier) för censurerade data.

³ Baserat på stratifierad Cox-regressionsmodell med behandling som kovariat.

⁴ NR = Ej uppnått

Figur 4 Kaplan-Meier-kurva – PFS hos HRD-positiva deltagare identifierade av TSO Comprehensive HRD (DRAGEN)



Referenser

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

15. Moore KN, Secord AA, Geller MA, et al. Niraparib monotherapy for late-line treatment of ovarian cancer (QUADRA): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):636-648. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30029-4
16. Lynparza (Olaparib) Prescribing Information. *U.S. Food and Drug Administration* (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208558s013lbl.pdf). Publicerad 2014. Uppdaterad oktober 2023. Åtkomst 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

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Beskrivning av ändring
Dokumentnr 200080934 v00	Maj 2026	Första versionen.

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs här och inte för något annat ändamål. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller någon rättighet i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas noggrant och uttryckligen av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivningen här. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkterna används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄR I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄR (INKLUSIVE DELAR DÄR ELLER PROGRAMVARAN).

© 2026 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformation



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

CE
2797



EC REP



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

Märkning av produkter

För en fullständig referens till symboler som visas på produktens förpackning och märkning, se symbolnyckeln på support.illumina.com på fliken *Documentation* (Dokumentation) för din sats.

En sammanfattning av säkerheten och prestanda finns på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, efter lanseringen av Europeiska databasen för medicintekniska produkter (Eudamed). Den är länkad till grundläggande UDI-DI (0081627002TSOHRDDGRK).