TruSight Oncology Comprehensive

illumina®

(EU) Bijsluiter

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Beoogd gebruik

TruSight Oncology Comprehensive (EU) is een test voor in-vitrodiagnostiek die gebruikmaakt van gerichte next-generation sequencing om varianten te detecteren in 517 genen met behulp van nucleïnezuren die zijn geëxtraheerd uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde ('formalin-fixed, paraffin-embedded', FFPE) tumorweefselmonsters van kankerpatiënten met solide maligne neoplasma's door middel van het Illumina® NextSeq™ 550Dx-instrument. De test kan worden gebruikt om enkelvoudige nucleotide-varianten, multinucleotide varianten, inserties, deleties en genamplificaties te detecteren in DNA, en genfusies en splicingvarianten in RNA. De test rapporteert ook een score voor tumormutatielast ('Tumor Mutational Burden', TMB) en een status voor microsatellietinstabiliteitstatus (MSI).

De test is bedoeld als een begeleidende diagnostiek voor het identificeren van kankerpatiënten voor behandeling met de gerichte therapie die wordt genoemd in Tabel 1, in overeenstemming met het goedgekeurde label voor het therapeutische product. Daarnaast is de test bedoeld voor het bieden van informatie over tumorprofilering die kan worden gebruikt door gekwalificeerde medische professionals in overeenstemming met professionele richtlijnen en is de test niet afdoende of voorschrijvend voor gelabeld gebruik van enig specifiek therapeutisch product.

Tabel 1 Indicatie begeleidende diagnostiek

Tumortype	Biomarkers	Gerichte therapie
Solide tumoren	NTRK1-, NTRK2- en NTRK3-genfusies	VITRAKVI® (larotrectinib)

Samenvatting en uitleg van de assay

Klinische beschrijving

Kanker is wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak en kan in elk weefsel ontstaan.[1] Analyse van de genetische basis van een tumor is belangrijk voor het identificeren van patiënten die baat kunnen hebben bij gerichte therapieën en voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmethoden. Er zijn talloze genen betrokken bij het ontstaan of de progressie van tumoren en veel tumoren zijn drager van een reeks varianten die deze genen en hun functies beïnvloeden. Deze varianten zijn onder andere genmutaties zoals single-nucleotide-varianten (SNV's), multi-nucleotide-varianten (MNV's), inserties of deleties, genamplificaties, genfusies en splicevarianten. Een ander gevolg van genmutaties in tumoren is het ontstaan van neo-antigenen die tumor-

specifieke immuunresponsen opwekken. De mutatiestatus van een tumor kan worden uitgedrukt in TMB en MSI. Dit zijn genomische signaturen die worden geassocieerd met de presentatie van neo-antigenen in tumoren.

TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) is een next-generation sequencing (NGS)-test voor uitgebreide genomische profilering (CGP) die een brede analyse maakt van genomische varianten in een groot panel kankergerelateerde genen die staan vermeld in Tabel 2. De assay detecteert kleine varianten in 517 genen, plus genamplificaties, fusies en splicevarianten zoals aangegeven in Tabel 2. De assay biedt dekking van de coderende sequentie voor alle genen behalve TERT, waar alleen de promoter-regio wordt gedekt. De assay beoordeelt ook de TMB-score en de MSI status. Deze assaydoelen omvatten inhoud die wordt aangehaald door professionele organisaties, zoals de European Society for Medical Oncology (ESMO) en andere belangrijke Amerikaanse richtlijnen.[2] Ook onafhankelijke publicaties van consortia en farmaceutisch onderzoek in een laat stadium hebben het ontwerp van de TSO Comprehensive-assay beïnvloed.

Raadpleeg voor een lijst van regio's die uitgesloten zijn van variantbepaling het bestand *TruSight Oncology Comprehensive Block List (documentnr. 200009524)* dat beschikbaar is via de ondersteuningswebsite van Illumina. De blokkeringslijst wordt in sommige bestanden ook wel de blacklist genoemd.

In Tabel 2 worden vier typen varianten geïdentificeerd: kleine DNA varianten (Small DNA, S), genamplificatie (A), fusie (F) en splicevarianten (Sp). Kleine DNA-varianten omvatten SNV's, MNV's en inserties en deleties.

Tabel 2 Genenpanel van de TSO Comprehensive (EU)-assay

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S

Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype	Nr.	Entrez-ID	Gen	Varianttype
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.

Principes van de procedure

De TSO Comprehensive (EU)-assay is een verspreide test die wordt uitgevoerd met geëxtraheerde nucleïnezuren als het inputmateriaal. DNA en/of RNA geëxtraheerd uit FFPE-weefsel wordt gebruikt om bibliotheken voor te bereiden die vervolgens worden verrijkt voor kankergerelateerde genen en worden

gesequencet op het NextSeq 550Dx-instrument.

De TSO Comprehensive (EU)-assay omvat vier hoofdprocessen.

- **Bibliotheekvoorbereiding en verrijking**: 40 ng totaal RNA wordt omgezet in dubbelstrengs complementair DNA (cDNA). 40 ng genomisch DNA (gDNA) wordt in kleine fragmenten verdeeld. Universele adapters voor sequencing worden geligeerd op de cDNA- en gDNA-fragmenten. P5- en P7-indexsequenties worden in elke bibliotheek verwerkt om de capture van bibliotheekfragmenten op het oppervlak van de stroomcel tijdens sequencing mogelijk te maken. De indexen omvatten een unieke reeks om elk afzonderlijk monster en, in het geval van bibliotheken van gDNA-monsters, afzonderlijke moleculen te identificeren met het gebruik van unieke moleculaire identificaties (UMI's). De bibliotheken worden vervolgens verrijkt voor de specifieke genen die van belang zijn met een op capture gebaseerde methode. Gebiotinyleerde probesequences die genregio's omvatten die van belang zijn waarop de assay zich richt worden gehybridiseerd naar de bibliotheken. De probes en gehybridiseerde doelbibliotheken worden geïsoleerd van bibliotheken waarop niet wordt gericht door capture met magnetische deeltjes met streptavidine. De verrijkte doelbibliotheken worden gewassen en geamplificeerd. De hoeveelheid van elke verrijkte bibliotheek wordt vervolgens genormaliseerd met een methode op basis van parels om gelijke representatie in de gepoolde bibliotheken voor sequencing te garanderen.
- **Sequencing en primaire analyse:** Genormaliseerde, verrijkte bibliotheken worden gepoold en geclusterd op een stroomcel en vervolgens gesequencet aan de hand van SBS-chemie ('sequencing by synthesis', synthesesequencing) op de NextSeq 550Dx. SBS-chemie maakt gebruik van een 'reversible-terminator' (omkeerbare terminator)-methode voor het detecteren van enkelvoudige met fluorescentie gelabelde deoxynucleotide-trifosfaat (dNTP-)basen terwijl zij in groeiende DNA-strengen worden opgenomen. Tijdens elke sequencingcyclus wordt een enkele dNTP toegevoegd aan de nucleïnezuurketen. Het dNTP-label dient als een terminator voor polymerisatie. Na elke opname van dNTP wordt de fluorescente kleurstof met beeldvorming weergegeven om de base te identificeren en vervolgens gespleten om opname van de volgende nucleotide mogelijk te maken. Vier reversible terminator-gebonden dNTP's (A, G, T en C) zijn aanwezig als enkele, afzonderlijke moleculen. Als gevolg daarvan minimaliseert de natuurlijke concurrentie opnamebias. Tijdens de primaire analyse worden direct basebepalingen gedaan vanaf signaalintensiteitsmetingen tijdens elke sequencingcyclus, resulterend in base-voor-base sequencing. Er wordt een kwaliteitsscore toegewezen aan elke basebepaling.
- **Secundaire analyse:** De Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodule bevindt zich op het NextSeq 550Dx-instrument als onderdeel van de Local Run Manager-software om het instellen van een TSO Comprehensive (EU)-run te vergemakkelijken en secundaire analyse van sequencingresultaten uit te voeren. Secundaire analyse omvat validatie van runverwerking en kwaliteitscontrole gevolgd door demultiplexen, generatie van FASTQ-bestanden, alignering en variantbepaling. Demultiplexen scheidt gegevens van gepoolde bibliotheken op basis van de unieke sequence-indexen die zijn toegevoegd tijdens de procedure voor bibliotheekpreparatie. Er worden tussentijdse FASTQ-bestanden gegenereerd die de sequencing-aflezingen bevatten voor elk monster en de kwaliteitsscores, met uitzondering van aflezingen van eventuele clusters die niet door het filter kwamen. De sequencing-aflezingen worden vervolgens gealigneerd ten opzichte van een referentiegenoom om een relatie tussen de sequences te identificeren en krijgen een score toegekend op basis van de regio's met gelijkenis. Gealigneerde aflezingen worden weggeschreven naar bestanden met een BAM-indeling. De assay-software maakt gebruik van afzonderlijke algoritmes voor bibliotheken gegenereerd uit DNA-

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

en/of RNA-monsters voor het bepalen van kleine DNA-varianten, genamplificaties, TMB en MSI bij DNA-monsters, en fusies en splicevarianten bij RNA-monsters. Er worden meerdere outputbestanden gegenereerd door de analysesoftwaremodule, waaronder sequencingmetrieken en VCF-bestanden ('Variant Call Format', variantbepalingsopmaak). VCF-bestanden bevatten informatie over varianten die op specifieke posities in een referentiegenoom is gevonden. Voor elk monster worden sequencingmetrieken en afzonderlijke uitvoerbestanden gegenereerd.

- **Tertiaire analyse:** Tertiaire analyse, uitgevoerd door de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module, bestaat uit TMB- en MSI-berekeningen, begeleidende diagnostische bepalingen, tumorprofilering van varianten in twee niveaus van klinische significantie aan de hand van een Kennisbank (KB) en het weefseltype, en het genereren van een resultatenrapport. Naar tumorprofilering kan ook worden verwezen als uitgebreide genomische profilering. De geïnterpreteerde variantresultaten, maar ook de TMB- en MSI-biomarkerresultaten, worden samengevat in het TSO Comprehensive (EU)-resultatenrapport.

Beperkingen van de procedure

Alleen voor gebruik bij *in-vitrodiagnostiek*.

- Uitsluitend voor gebruik op recept. De test moet worden gebruikt in overeenstemming met klinische laboratoriumvoorschriften.
- Genomische bevindingen vermeld in Tabel 2 voor het beoogde gebruik zijn niet voorschrijvend of afdoende voor gelabeld gebruik van enig specifiek therapeutisch product.
- Voor varianten vermeld in het TSO Comprehensive (EU)-resultatenrapport onder Genomische bevindingen met aanwijzingen voor klinische significatie en Genomische bevindingen met mogelijke klinische significantie, is geen klinische validatie uitgevoerd.
- Beslissingen met betrekking tot patiëntenzorg en behandeling moeten gebaseerd worden op het onafhankelijke medische oordeel van de behandelend arts, waarbij rekening moet worden gehouden met alle van toepassing zijnde informatie over de toestand van de patiënt, zoals de geschiedenis van de patiënt en diens familie, lichamelijke onderzoeken, informatie van andere diagnostische tests en patiëntvoorkeuren, in overeenstemming met de zorgstandaard in een bepaalde gemeenschap.
- De kwaliteit van een FFPE-monster is zeer variabel. Monsters die geen standaard fixatieprocedures hebben ondergaan genereren mogelijk geen geëxtraheerde nucleïnezuren die voldoen aan de kwaliteitscontrolevereisten van de assay (*Kwaliteitscontrole* op pagina 81). FFPE-blokken die langer dan vijf jaar zijn bewaard, vertonen een lagere validiteit.
- De prestatie van TSO Comprehensive (EU) bij monsters die zijn verkregen van patiënten die een orgaan- of weefseltransplantatie hebben ondergaan, is niet geëvalueerd.
- Bij sterk herschikte genomen met deleties en verlies van heterozygositeit kan TSO Comprehensive (EU)-software een DNA-monster ten onrechte als verontreinigd classificeren (CONTAMINATION_SCORE > 3106 en p-waarde > 0,049).

- Een negatief resultaat sluit de aanwezigheid van een mutatie onder de detectielimieten (LoD) van de assay niet uit.
- De gevoeligheid voor detectie van kleine DNA-varianten kan worden beïnvloed door:
  - Lage complexiteit van de genomische context.
  - Toenemende variantlengte.
- TMB-scores kunnen in de volgende contexten onjuist zijn:
  - Als de tumorinhoud niveaus bereikt waar kiemlijn en somatische variantallelfrequenties (VAF's) samenkomen.
  - In populaties die niet goed zijn vertegenwoordigd in publieke databases.
- De gevoeligheid voor detectie van fusie kan beïnvloed worden:
  - Door lage bibliotheekcomplexiteit, wat resulteert in afnemende ondersteunende bepalingen als gevolg van afwijkingen in de assay-workflow (bijvoorbeeld, volg mengstappen in *Denaturatie en hybridisatie RNA* op pagina 46).
  - Als één enkel gen beide breekpunten bestrijkt.
  - In gevallen waarbij meerdere fusiebreekpunten erg dicht bij elkaar zijn met één of meerdere partners, dan zouden de meerdere breekpunten en partners kunnen worden gerapporteerd als één breekpunt.
  - Door kleine mediane insertiegroottes; een minimale mediane insertiegrootte van 80 bp is vereist, maar de gevoeligheid neemt af in het bereik 80–100 bp.
  - Door lage sequentiecomplexiteit of homologe genomische context rond fusiebreekpunten.
- De resolutie van de genen betrokken bij een fusie kan beïnvloed raken als fusiebreekpunten optreden in genomische regio's met overlappende genen. De assay rapporteert alle genen, gescheiden door puntkomma's, als er meerdere genen een breekpunt overlappen.
- Inconsistente dekking in de TERT Promoter-regio kan resulteren in 'Geen resultaat' als gevolg van lage diepte.
- Annotatie of KB-fouten kunnen een fout-positief of fout-negatief resultaat veroorzaken, waaronder het vermelden van een variant in het verkeerde niveau (tussen Genomische bevindingen met aanwijzingen voor klinische significantie en Genomische bevindingen met mogelijke klinische significantie), of de annotatie-informatie in het rapport kan onjuist zijn. De kans op fouten bestaat bij drie bronnen:
  - TSO Comprehensive (EU)-annotatie van de variant. Er is een foutpercentage van ongeveer 0,0027% op basis van een analyse van 2.448.350 varianten uit COSMIC v92, daardoor is er een kleine kans op fouten.
  - KB-fout als gevolg van het curatie- of tieringproces.
  - De relevantie van KB-content verandert met het verloop van tijd. Dit rapport weerspiegelt de kennis op het moment dat de KB-versie werd samengesteld.
  - Varianten in de resultaten van de begeleidende diagnostiek worden niet beïnvloed door annotatie- of kennisbankfouten.

- TSO Comprehensive (EU) is ontworpen voor het rapporteren van somatische varianten bij rapportage van varianten met bewijs van klinische relevantie of varianten met mogelijke klinische relevantie. Aangezien dit een test is die enkel op tumoren betrekking heeft, is rapportage van (overervende) kiemlijnvarianten mogelijk, maar dit is niet het doel van de test. TSO Comprehensive (EU) gebruikt een kennisbank om varianten te rapporteren zonder expliciet te annoteren of ze van kiemlijn- of somatische oorsprong zijn.
- De kennisbank bevat alleen therapeutische, diagnostische en prognostische associaties die relevant zijn voor varianten in een vastgestelde tumor. Gevoeligheids- of kankerrisicoassociaties zijn niet opgenomen in de kennisbank.

Productonderdelen

De TruSight Oncology Comprehensive (EU)-test bestaat uit de volgende onderdelen:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) Kit (Illumina, catalogusnr. 20063092) – De kit bevat reagentia in voldoende hoeveelheden om 48 bibliotheken te genereren (24 DNA-bibliotheken en 24 RNA-bibliotheken). Het reagensvolume is ook voldoende voor controles.
- Kennisbank – Wordt maandelijks bijgewerkt en is te downloaden op het Illumina Lighthouse-portaal.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodule – Een onderhoudsvertegenwoordiger van Illumina installeert één van de volgende beschikbare versies op het NextSeq 550Dx-instrument:
  - Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodule (Illumina, catalogusnr. 20051843), deze module omvat de volgende onderdelen en ondersteunt tumorprofilering en NTRK:
    - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.1.0 (onderdeelnr. 20079589)
    - TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 softwarepakket (onderdeelnr. 20079588)
    - TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 USB Kit (onderdeelnr. 20079591)
  - Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodule (Illumina, catalogusnr. 20051843), deze module omvat de volgende onderdelen en ondersteunt tumorprofilering en NTRK:
    - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (onderdeelnr. 20051760)
    - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 softwarepakket (onderdeelnr. 20075244)
    - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 USB Kit (onderdeelnr. 20075239)

Reagentia

Meegeleverde reagentia

De volgende reagentia worden meegeleverd met de TSO Comprehensive (EU)-assaykit.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, onderdeelnr. 20031127

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en nucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten, DNA-polymerase, RNase H en nucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en willekeurige hexameren bevat.	-25 °C tot -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Gebufferde waterige oplossing die reverse-transcriptase bevat.	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (invriezen), onderdeelnr. 20031118

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
End Repair -tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Gebufferde waterige oplossing die T4 DNA-polymerase en polynucleotidekinase bevat.	-25 °C tot -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en nucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	-25 °C tot -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Gebufferde waterige oplossing die ligase bevat.	-25 °C tot -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en sequencing-oligonucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten en sequencing-oligonucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	-25 °C tot -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gebufferde waterige oplossing die DNA-polymerase en nucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (koel bewaren), onderdeelnr. 20031119

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	2 °C tot 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Waterige oplossing die magnetische parels bevat.	2 °C tot 8 °C
TE Buffer (TEB)	20031443	1	10 ml	Tris EDTA-oplossing.	2 °C tot 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, onderdeelnr. 20031120

Werkzame bestanddelen: gebufferde waterige oplossing met daarin oligonucleotide primers met afzonderlijke barcodes.

Opmerking Gebruik unieke indexprimers (UPxx) voor RNA- of DNA monsters.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, onderdeelnr. 20031126

Werkzame bestanddelen: gebufferde waterige oplossing met daarin oligonucleotide primers met afzonderlijke barcodes.

LET OP

Gebruik combinatie-indexprimers (CPxx) alleen voor DNA -monsters (FFPE-workflow)

Index-primer	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	i7-index	Sequencen	i5-index	Sequencen	Opslag-temperatuur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C tot -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C tot -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C tot -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C tot -15 °C

Index-primer	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	i7-index	Sequencen	i5-index	Sequencen	Opslag-temperatuur
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C tot -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C tot -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C tot -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C tot -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C tot -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C tot -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C tot -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C tot -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C tot -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C tot -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C tot -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (koel bewaren), onderdeelnr. 20031123

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslag-temperatuur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Gebufferde waterige oplossing die formamide en zouten bevat.	2 °C tot 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Gebufferde waterige oplossing met zouten en paramagnetische parels in de vaste fase covalent gecoat met streptavidine.	2 °C tot 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroxideoplossing.	2 °C tot 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Gebufferde waterige oplossing.	2 °C tot 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Gebufferde waterige oplossing met paramagnetische parels in de vaste fase.	2 °C tot 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Gebufferde waterige oplossing met zouten, 2-mercapto-ethanol en formamide.	2 °C tot 8 °C

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslag-temperatuur
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	2 °C tot 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	2 °C tot 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Waterige oplossing die magnetische parels bevat.	2 °C tot 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (invriezen), onderdeelnr. 20031121

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslag-temperatuur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Gebufferde waterige oplossing die oligonucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	-25 °C tot -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Gebufferde waterige oplossing die reinigingsmiddel bevat.	-25 °C tot -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Gebufferde waterige oplossing die DNA-polymerase en nucleotiden bevat.	-25 °C tot -15 °C
PCR-primercocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Gebufferde waterige oplossing die P5- en P7-primers bevat.	-25 °C tot -15 °C

Reagens	Onderdeel-nummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslag-temperatuur
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten, 2-mercapto-ethanol en formamide bevat.	-25 °C tot -15 °C
PhiX Internal Control (PhiX)	20031492	1	10 µl	Gebufferde waterige oplossing die PhiX genomisch DNA bevat.	-25 °C tot -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, onderdeelnr. 20031122

Reagens	Onderdeelnummer	Aantal	Volume	Werkzame bestanddelen	Opslagtemperatuur
Oncology RNA Probe Pool 1 (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonucleotide probe pool.	-25 °C tot -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonucleotide probe pool.	-25 °C tot -15 °C

Benodigde, maar niet meegeleverde reagentia

Reagentia vóór amplificatie

- Reagentia voor DNA- en RNA-extractie en -zuivering – raadpleeg *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 23* voor reagensvereisten.
- Reagentia voor DNA- en RNA-kwantificatie – raadpleeg *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren op pagina 23* voor reagensvereisten.
- TruSight Oncology DNA Control (Illumina catalogusnr. 20065041)
- TruSight Oncology RNA Control (Illumina catalogusnr. 20065042)
- Ethanol 100% (200 proeven) voor moleculaire biologie
- RNase/DNase-vrij water

Reagentia na amplificatie

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycli) (Illumina catalogusnr. 20028871)

- NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycli)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycli)
  - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycli)
- Ethanol 100% (200 proeven) voor moleculaire biologie
- RNase/DNase-vrij water

Hantering en opslag van reagentia

- De volgende dozen met reagentia worden ingevroren verzonden. Bewaren bij -25 °C tot -15 °C.

Doos	Onderdeelnummer	Labgebied
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Library Prep (invriezen)	20031118	Pre-amp
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amp
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Enrichment (invriezen)	20031121	Post-amp
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amp

LET OP

Bewaar reagentia niet in een vorstvrije opslagunit of in een deurvak van een koelkast.

- De volgende reagentiadozen worden verzonden op gelverpakkingen om de temperatuur op 0 °C tot 10 °C te houden. Bewaren bij 2 °C tot 8 °C.

Doos	Onderdeelnummer	Labgebied
TruSight Oncology Comp Library Prep (koel bewaren)	20031119	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Enrichment (koel bewaren)	20031123	Post-amp

LET OP

Vries reagentia met parels (LNB1, SPB en SMB) niet in.

- Uiterlijke veranderingen in de reagentia kunnen duiden op kwaliteitsverslechtering van de materialen. Als er sprake is van uiterlijke veranderingen (zoals duidelijke veranderingen in de kleur van het reagens of troebelheid), mogen de reagentia niet worden gebruikt.
- Stabiliteit van de TSO Comprehensive (EU)-assay is beoordeeld en de prestatie is aangetoond voor tot maximaal viermaal gebruik van de kit. Reagentia zijn stabiel mits opgeslagen bij de aangegeven temperaturen en tot de aangegeven vervaldatum vermeld op het label op de doos.

Apparatuur en materialen

Benodigde, maar niet meegeleverde apparatuur en materialen

Apparatuur en materialen voor pre-amplificatie

Apparatuur	Leverancier
Ultrasonicator met bijbehorende accessoires Raadpleeg *Optimalisering van ultrasonicators om DNA te fragmenteren op pagina 21*.	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Thermocycler met de volgende specificaties: • Verwarmd deksel dat kan worden ingesteld op 30 °C en 100 °C (of kan worden uitgeschakeld als 30 °C niet mogelijk is) • Temperatuurbereik 4 °C tot 100 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ± 0,25 °C • Compatibel met PCR-platen met 96-wells, 0,2 ml (polypropyleen)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Vortexer	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Micromonsterincubators (2) met inzetstukken voor 96-wells MIDI-platen (2)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifuge	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Centrifuge (plaatcentrifuge) met de volgende capaciteiten: • Centrifugeren van microplaten met 96-wells • Vermogen van 280 x g	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Plaatschudder met de volgende capaciteiten: • Orbitale straal van 2 mm • Kan schudden met 1200 tpm en 1800 tpm	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Afsluitwig of sealroller	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Magnetische standaard met de volgende specificaties: • Ontworpen voor precipitatie/separatie van paramagnetische parels • Magneten aan de zijkant van de standaard, niet aan de onderkant • Voor MIDI-platen met 96-wells	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur	Leverancier
Precisiepipetten • 20 µl enkel- of meerkanaals pipetten • 200 µl enkel- of meerkanaals pipetten • 1000 µl enkel- of meerkanaals pipetten Die voldoen aan de volgende vereisten: • Regelmatig gekalibreerd, binnen 5% nauwkeurigheid	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipethulpmiddel	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
10 ml serologische pipetten	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Klevende afdichting voor platen met 96-wells met de volgende specificaties: • Afpelbaar, optisch transparant polyester • Geschikt voor volledig of gedeeltelijk omrande PCR -platen • Sterk kleefmiddel dat meerdere temperatuurveranderingen van -40 °C tot 110 °C kan weerstaan • DNase/RNase-vrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
1,7 ml microcentrifugebuisjes, nucleasevrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Nucleasevrije reagensreservoirs (PVC, wegwerpbakje, 50 ml)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
15 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
50 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
20 µl aerosolresistente pipettips	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
200 µl aerosolresistente pipettips	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
1000 µl aerosolresistente pipettips	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Opslagplaten voor 96-wells, 0,8 ml (MIDI-platen)	Fisher Scientific, onderdeelnr. AB-0859 of gelijkwaardig
96-wells PCR-platen, 0,2 ml (polypropyleen)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur en materialen voor post-amplificatie

Apparatuur	Leverancier
NextSeq 550Dx-instrument	Illumina, catalogusnr. 20005715
Centrifuge (plaatcentrifuge) met de volgende capaciteiten: • Centrifugeren van microplaten met 96-wells • Vermogen van 280 x g	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Thermocycler met de volgende specificaties: • Verwarmd deksel (100 °C) • Temperatuurbereik 4 °C tot 100 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ± 0,25 °C • Compatibel met PCR-platen met 96-wells, 0,2 ml (polypropyleen)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Vortexer	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Micromonsterincubator met inzetstuk voor MIDI-platen met 96-wells	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Verwarmingsblok droge warmte met de volgende specificaties: • Temperatuurbereik 25 °C tot 99 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ± 5 °C	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Plaatschudder met de volgende capaciteiten: • Orbitale straal van 2 mm • Kan schudden met 1200 tpm en 1800 tpm	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifuge	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Afsluitwig of sealroller	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Magnetische standaard met de volgende specificaties: • Ontworpen voor precipitatie/separatie van paramagnetische parels • Magneten aan de zijkant van de standaard, niet aan de onderkant • Voor MIDI-platen met 96-wells	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Precisiepipetten • 20 µl enkel- of meerkanaals pipetten • 200 µl enkel- of meerkanaals pipetten • 1000 µl enkel- of meerkanaals pipetten Die voldoen aan de volgende vereisten: • Regelmatig gekalibreerd, binnen 5% nauwkeurigheid	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Apparatuur	Leverancier
Pipethulpmiddel	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
10 ml serologische pipetten	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Klevende afdichting voor platen met 96-wells met de volgende specificaties: • Afpelbaar, optisch transparant polyester • Geschikt voor volledig of gedeeltelijk omrande PCR -platen • Sterk kleefmiddel dat meerdere temperatuurveranderingen van -40 °C tot 110 °C kan weerstaan • DNase/RNase-vrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifugebuisjes, nucleasevrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Nucleasevrije reagensreservoirs (PVC, wegwerpbakje, 50 ml)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
15 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
50 ml conische buizen	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
20 µl aerosolresistente pipettips	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
200 µl aerosolresistente pipettips	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
1000 µl aerosolresistente pipettips	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Opslagplaten voor 96-wells, 0,8 ml (MIDI-platen)	Fisher Scientific, onderdeelnr. AB-0859 of gelijkwaardig
96-wells PCR-platen, 0,2 ml (polypropyleen)	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Optimalisering van ultrasonicators om DNA te fragmenteren

DNA-fragmentatie of -afschuiving is van invloed op de testprestaties doordat de verdeling van fragmentgrootte wordt bepaald, die op zijn beurt weer sequencing-dekking beïnvloedt. Verschillende gefocuste-ultrasonicatieconfiguraties werden geëvalueerd en geoptimaliseerd voor de TSO Comprehensive (EU)-assay (Tabel 3). De tijd voor afschuiven werd aangepast om de meting voor MEDIAN_EXON_COVERAGE zoals

aangegeven in het gedeelte Kwaliteitscontrole te maximaliseren. Tijden voor afschuiven (vetgedrukt in Tabel 3) verschilden tussen de configuraties, net als de resultaten voor MEDIAN_INSERT_SIZE. Alle drie de configuraties werden getest met buisjes met 8 strips; de gebruikte volumes worden getoond in Tabel 3.

Optimalisatie van configuratie 3 (punttransducer, niet-ontgast water, klein waterbadvolume) gebruikte pulsering en had de kortste tijd voor afschuiven, wat resulteert in een iets grotere fragmentgrootteverdeling dan de andere twee configuraties (MEDIAN_INSERT_SIZE was ongeveer 5-10 basenparen groter). Bovendien had configuratie 3 een grotere DNA-input (50 ng) nodig om een vergelijkbare MEDIAN_EXON_COVERAGE te bereiken in vergelijking met de twee andere configuraties, waarin de nominale input van 40 ng werd gebruikt. Configuratie 3 heeft meer schade en/of denaturatie en daardoor een verminderde effectieve massa bruikbare dsDNA-moleculen voor bibliotheekpreparatie.

Het wordt aanbevolen de buisjes voor afschuiven te centrifugeren tijdens het terugwinproces om te waarborgen dat het gespecificeerde volume wordt teruggewonnen, omdat elk verlies van materiaal de prestaties negatief kan beïnvloeden.

Tabel 3 Geëvalueerde gefocuste-ultrasonicatorconfiguraties

	Configuratie		
Parameter	**1**	**2**	**3**
Transducer	Lijn	Punt	Punt
Waterbadvolume	5 l	5 l	85 ml
Water ontgast	Ja	Ja	Nee
Waterkoeler	Ja	Ja	Ja
Waterbadtemperatuur	7 °C	7 °C	12 °C
Piek-incidentievermogen (PIP)	450 W	175 W	50 W
% inschakelduur	30	10	30
Cycli per burst	200	200	1000
Pulsering (bursts van 10 seconden)	Nee	Nee	Ja
Tijd voor afschuiven	**250 s**	**280 s**	**200 s***
Monsterverwerking	1-8	1	1
Batchgrootte	1-96	1-96	1-8
Monstergrootte glazen buis 8 strips	130 µl	130 µl	50 µl
Equivalent DNA-input (voor mediane exondekking)	40 ng	40 ng	50 ng

* De afschuivingstijd van 200 seconden bestaat uit bursts van 10 seconden met 20 herhalingen.

Stijgingssnelheid thermocycler

De stijgingssnelheid van de thermocycler heeft invloed op de QC-meetgegevens van de assay – bruikbare MSI-locaties, mediane bin-telling CNV-doel, mediane inbrenggroote (RNA) – maar ondersteunent ook de aflezing van splicevarianten en fusies. Optimalisatie van de stijgingssnelheid van de thermocycler wordt aanbevolen.

Afname, transport en opslag van monsters

Volg de standaardprocedure bij het verzamelen, vervoeren, bewaren en verwerken van tumorweefselmonsters.

Weefselvereisten

De TSO Comprehensive (EU)-assay vereist 40 ng RNA en/of 40 ng DNA geëxtraheerd uit FFPE-weefsel. Door zowel RNA als DNA te gebruiken, kunnen alle geclaimde varianten worden geanalyseerd. Het weefsel moet worden gefixeerd met een formalinefixeermiddel dat geschikt is voor moleculaire analyses, bijvoorbeeld 10% neutraal gebufferde formaline. Weefsel kan niet worden ontkalkt. Voorafgaand aan het uitvoeren van de TSO Comprehensive (EU)-assay, moet het weefselmonster worden onderzocht door een patholoog om er zeker van te zijn dat het geschikt is voor deze test. Er is een minimum van 20% tumorcontent (per gebied) nodig om somatische driver-mutaties te detecteren. Er is een minimum van 30% tumorcontent nodig om MSI-High te detecteren. De tumorcontent voor genamplificaties en RNA-varianten is afhankelijk van de mate van amplificatie of expressie (raadpleeg *Tumorinhoud* op pagina 103).

Voor een hoge waarschijnlijkheid van het extraheren van 40 ng RNA en 40 ng DNA uit verschillende solide weefseltypen, is het aanbevolen weefselvolume ≥ 1,0 mm^3, wat gelijk staat een cumulatief levensvatbaar weefselgebied van ≥ 200 mm^2 met gebruik van 5 µm dikke secties of ≥ 100 mm^2 bij gebruik van 10 µm dikke secties. Cumulatief weefselgebied is de som van het levensvatbare weefselgebied in alle secties die zijn ingediend voor extractie. Bijvoorbeeld, een cumulatief weefselgebied van 200 mm^2 kan worden verkregen door vier secties van 5 µm met elk 50 mm^2 weefselgebied of vijf secties van 10 µm met elk 20 mm^2 weefselgebied te extraheren. Weefselnecrose kan de opbrengst van de hoeveelheid nucleïnezuur verlagen. Om de mogelijkheid van fout-negatieve resultaten te minimaliseren kan macrodissectie worden toegepast op het weefsel om een gewenste levensvatbare tumorcontent te bereiken.

Een grote hoeveelheid necrotisch weefsel (≥ 25%) kan het vermogen van de TSO Comprehensive (EU)-assay om genamplificaties en RNA-fusies te detecteren, verstoren.

Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren

- Extraheer RNA en DNA uit FFPE-weefselmonster met commercieel verkrijgbare extractiekits. Verschillen in extractiekits kunnen van invloed zijn op de prestaties. Raadpleeg *Evaluatie nucleïnezuur-extractiekit* op pagina 94.
- Bewaar voorraad geëxtraheerd nucleïnezuur volgens de instructies van de fabrikant van de extractiekit.

- Meet DNA en RNA direct voordat de bibliotheekpreparatie wordt gestart om veranderingen in concentratie in de loop der tijd te vermijden. Kwantificeer RNA en DNA met een fluorometrische kwantificatiemethode die gebruik maakt van nucleïnezuurbindende kleurstoffen. De nucleïnezuurconcentratie moet het gemiddelde van de laatste drie metingen zijn.
- De assay vereist 40 ng van elk RNA-monster voorbereid in RNase/DNase-vrij water (niet meegeleverd), met een uiteindelijk volume van 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- De assay vereist 40 ng van elk gDNA-monster met een minimale extractieconcentratie van 3,33 ng/µl. Voor het afschuiven is een eindvolume van 52 µl (0,77ng/µl) nodig, met minimaal 40 µl TEB (meegeleverd) als verdunningsmiddel.

Bibliotheekopslag

U kunt bibliotheken 7 tot 30 dagen opslaan in PCR platen met lage binding, afhankelijk van het type bibliotheek (raadpleeg Tabel 4).

Tabel 4 Bibliotheekopslagtijden

Bibliotheektype	Plaat	Aantal dagen	Opslagtemperatuur
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C tot -15 °C
Gefragmenteerd gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C tot -15 °C
Voor verrijking	ALS PCR	≤ 30	-25 °C tot -15 °C
Na verrijking	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C tot -15 °C
PCR na verrijking	PL PCR	≤ 30	-25 °C tot -15 °C
Genormaliseerd	NL PCR	≤ 30	-25 °C tot -15 °C

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Veiligheid

1. **Sommige onderdelen van deze assay bevatten mogelijk gevaarlijke chemicaliën. Inademen, inslikken en contact met de huid en met de ogen kunnen resulteren in persoonlijk letsel. Draag beschermende hulpmiddelen, met inbegrip van oogbescherming, handschoenen en een laboratoriumjas, passend bij het blootstellingsrisico. Behandel gebruikte reagentia als chemisch afval en voer deze af in overeenstemming met de geldende regionale, nationale en lokale wet- en regelgeving.** Ga voor Safety Data Sheets (SDS - veiligheidsinformatiebladen) naar support.illumina.com/sds.html.
2. Hanteer alle specimens alsof dit infectieuze stoffen zijn.

3. Volg de standaard voorzorgsmaatregelen die in het laboratorium gelden. Pipetteer niet met de mond. Niet eten, drinken of roken in de aangegeven werkgebieden. Draag wegwerphandschoenen en een laboratoriumjas bij het hanteren van monsters en assayreagentia. Was de handen grondig na het hanteren van monsters en assayreagentia.

Laboratorium

1. Richt het laboratorium in met een unidirectionele workflow om contaminatie te voorkomen. Zones voor pre-amplificatie en post-amplificatie moeten voorzien zijn van speciale apparatuur en materialen (bijvoorbeeld, pipetten, pipettips, vortexer en centrifuge). Om overdracht van het amplificatieproduct of de probe te voorkomen moet u terugkeren naar de pre-amplificatiezone vermijden na betreden van de post-amplificatiezone.
2. Voer de stappen 'PCR indexeren' en 'Verrijking' uit in een post-amplificatiezone om overdracht van amplificatieproduct te voorkomen.
3. De procedures voor bibliotheekpreparatie vereisen een RNase/DNase-vrije omgeving. Ontsmet de werkgebieden grondig met een RNase/DNase-remmend reinigingsmiddel. Gebruik plastic dat gecertificeerd vrij is van DNase, RNase en humaan genomisch DNA.
4. Reinig voor post-amplificatieprocedures de oppervlakken en apparatuur grondig voor en na elke procedure met een vers gemaakte 0,5% natriumhypochlorietoplossing (NaOCl). Laat de oplossing 10 minuten contact maken met de oppervlakken en veeg het daarna grondig af met 70% ethyl- of isopropylalcohol.
5. Gebruik nuclease-vrije microcentrifugebuisjes, platen, pipettips en reservoirs.
6. Gebruik bij de assay gekalibreerde apparatuur. Zorg dat de apparatuur is gekalibreerd op de snelheden, temperaturen en volumes die in dit protocol worden gespecificeerd.
7. Gebruik precisiepipetten om een nauwkeurige reagens- en monsterafgifte te garanderen. Kalibreer regelmatig in overeenstemming met de specificaties van de fabrikant.
8. Gebruik de volgende richtlijnen bij het gebruik van meerkanaals pipetten:
   - Pipetteer minimaal ≥ 2 µl.
   - Zorg dat barrièretips goed passen en geschikt zijn voor het merk en model van de meerkanaals pipet.
   - Bevestig tips in een vloeiende rollende beweging meteen achter elkaar aan om er zeker van te zijn dat de tips allemaal even goed zijn bevestigd.
   - Aspireer in een hoek van 90° met gelijke volumes vloeistof bij alle tips.
   - Controleer na het dispensen of de vloeistof uit elke tip is gedispenseerd.
9. Zorg dat u alleen apparatuur gebruikt die is gespecificeerd voor de assay en dat u de programma's volgens de aanwijzingen instelt.
10. De vermelde temperaturen voor de thermocycler en de micromonsterincubator geven de reactietemperatuur aan, niet per se de ingestelde temperatuur van de apparatuur.

Assay

1. Vermijd kruisverontreiniging.
   - Volg de betreffende laboratoriumpraktijken bij het hanteren van monsters en reagentia.
   - Gebruik verse verbruiksmaterialen voor laboratoria en verse pipettips tussen monsters en tussen het dispenseren van reagentia.
   - Gebruik aerosolbestendige tips om het risico op kruisverontreiniging te verkleinen.
   - Gebruik een unidirectionele workflow bij het verplaatsen van zones voor pre-amplificatie naar zones voor post-amplificatie.
   - Hanteer en open slechts één indexprimer per keer. Doe na gebruik onmiddellijk de dop terug op elk indexbuisje. In de kit zitten extra dopjes.
   - Verwissel regelmatig uw handschoenen, maar ook als zij in contact zijn geweest met indexprimers of monsters.
   - Verwijder buisjes met ongebruikte indexprimer uit het werkgebied.
   - Doe reagentia niet terug in voorraadbuisjes na gebruik met een buisjesstrip, bak of reservoir.
   - Meng monsters met een pipet en centrifugeer de plaat wanneer dat wordt aangegeven.
   - Gebruik een microplaatschudder. Vortex de platen niet.
2. Wissel de assay-onderdelen van verschillende reagenskitpartijen niet onderling uit. Reagenskitpartijen worden geïdentificeerd op het etiket van de doos van de reagenskit en het hoofdpartijblad.
3. Goede laboratoriumpraktijken zijn vereist om te voorkomen dat reagentia, instrumenten, monsters en bibliotheken worden verontreinigd door nucleasen en PCR-producten. Verontreiniging met een nuclease en een PCR-product kan onjuiste en onbetrouwbare resultaten veroorzaken.
4. Het juiste plaattype is vereist voor optimale assayprestaties en opslag. Zorg dat u de instructies voor plaatoverdracht in de *Gebruiksaanwijzing* op pagina 35 volgt.
5. Wanneer de omschreven procedures niet worden gevolgd, kunnen de resultaten onjuist zijn of kan de bibliotheekkwaliteit significant slechter zijn.
6. Tenzij er in de *Gebruiksaanwijzing* op pagina 35 een veilig stoppunt is aangegeven, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.
7. Bewaar de reagentia of componenten van de assay op de gespecificeerde temperatuur in de daarvoor aangewezen zones voor pre-amplificatie en post-amplificatie.
8. Bewaar reagentia niet in een vorstvrije opslagunit of in een deurvak van een koelkast.
9. Vries reagentia met parels (LNB1, SPB en SMB) niet in.
10. Gebruik geen reagentia die niet juist zijn bewaard.
11. Wijk niet af van de procedures voor mengen en hanteren die voor elk reagens zijn gespecificeerd. Onvolledig mengen of overmatig vortexen van reagentia kan resulteren in mislukte monsterresultaten.
12. Bereid vers mastermengsel en gooi het resterende volume na gebruik weg.

13. Bereid verse 80% ethanol altijd met RNase/DNase-vrij water voor de wasstappen. Ethanol kan water uit de lucht absorberen, wat invloed kan hebben op de resultaten. Gooi 80% ethanol na gebruik weg in overeenstemming met lokale, provinciale en/of nationale voorschriften.
14. Breng het gespecificeerde eluaatvolume over. Het overbrengen van minder dan het gespecificeerde volume eluaat tijdens de elutiestappen kan de resultaten beïnvloeden.
15. Gebruik de volgende richtlijnen voor ultrasonicators. Zorg dat u de instructies van de fabrikant volgt.
    - Doe het gDNA langzaam in het ultrasonicatorbuisje om de vorming van luchtbellen te voorkomen. Te veel bellen of een luchtholte in het shearing-buisje kan leiden tot onvolledige fragmentatie.
    - Langzaam in de ultrasonicatorbuisjes dispenseren en voorkom spatten.
    - Steek om verplaatsing van vloeistof en verlies van monster te voorkomen de pipettip niet in de bodem van het ultrasonicatorbuisje bij het verwijderen van gefragmenteerd DNA.
16. Pipetteer niet minder dan 2 µl monsterinvoer.
17. Gebruik geen bak om reagentia weg te gooien bij stappen waarbij minder dan 10 µl materiaal hoeft te worden toegevoegd aan elke monsterwell.
18. Gebruik een P20-pipet bij het overbrengen van gefragmenteerd gDNA-monster van de ultrasonicatorbuisjes naar de LP-plaat ('Library Prep', bibliotheekpreparatie).
19. Combineer UMI- en SUA1-adapters niet met elkaar.
20. Gebruik SUA1-adapters bij RNA-monsters.
21. Gebruik UMI-adapters bij DNA-monsters.
22. Wijs verschillende indexprimers toe aan elk bibliotheekmonster om elke bibliotheek wanneer deze is gepoold voor sequencing op één enkele stroomcel uniek te kunnen identificeren.
23. Combineer CPxx- en UPxx-indexprimers niet met elkaar in dezelfde bibliotheek.
24. Verkeerde combinaties tussen monsters en indexeringsprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportages vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie. Voer monster-ID's in en wijs indexen toe in Local Run Manager voordat u met de bibliotheekpreparatie begint. Registreer tijdens de bibliotheekpreparatie als referentie monster-ID's, indexeringen en de locatie van de wells op de plaat.
25. Gebruik alleen UPxx-indexen voor bibliotheken afgeleid van RNA-monsters.
26. Gebruik UPxx- of CPxx-indexen voor bibliotheken afgeleid van DNA-monsters.
27. Sequence 8 RNA bibliotheken en 8 DNA-bibliotheken per stroomcel. Raadpleeg *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32.
28. Sequence minimaal drie bibliotheken. Volg de richtlijnen in *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32.
29. Ga na de bindingsstap in *Capture doelen – één* op pagina 62 en *Capture doelen – twee* op pagina 65 onmiddellijk door naar de wasstap om te voorkomen dat parelpellets opdrogen.
30. Zorg dat bij de wasstappen alle 80% ethanol wordt verwijderd van de bodem van de wells. Resterend ethanol kan invloed hebben op de resultaten.
31. Volg voor een optimale assayprestatie het gespecificeerde aantal wasbeurten dat wordt aangegeven in de *Gebruiksaanwijzing* op pagina 35.

32. Resuspendeer tijdens de procedure *Bibliotheken normaliseren* op pagina 72 het parelpellet van de bibliotheek grondig om een consistente clusterdichtheid op de stroomcel te bereiken.

Procedurele opmerkingen

- De TSO Comprehensive (EU)-workflow kan worden uitgevoerd volgens het volgende schema.
  - Dag 1: cDNA-synthese uit RNA-monsters, DNA-fragmentatie van gDNA-monsters, bibliotheekpreparatie en begin nachtelijke (eerste) hybridisatie.
  - Dag 2: Verrijking, normalisatie van verrijkte bibliotheken en laden van bibliotheken op het NextSeq 550Dx-instrument.

  Indien het niet mogelijk is de TSO Comprehensive (EU)-workflow uit te voeren volgens dit schema, zijn er verschillende stoppunten gespecificeerd in het gehele protocol. Tenzij er in het protocol een veilig stoppunt is aangegeven, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.
- Bibliotheken afgeleid van RNA- en DNA-monsters kunnen gelijktijdig in afzonderlijke wells worden bereid.
- Tabellen voor de bereiding van mastermengsels omvatten volumeoverschotten om er zeker van te zijn dat er voldoende volume is voor het aantal monsters dat wordt verwerkt.
- Gebruik water van moleculaire graad dat vrij is van nucleasen.
- Spoel na toevoeging van het reagens de tip door één keer uit de betreffende well in de plaat te aspireren en terug te dispenseren, tenzij anders wordt gespecificeerd in de procedure.
- Kamertemperatuur wordt gedefinieerd als 15 °C tot 30 °C.

Thermocyclerprogramma's

- Programmeer thermocyclerprogramma's op apparatuur voor pre-amplificatie en post-amplificatie voordat u het protocol start.
- Zorg dat de PCR-platen goed in de thermocycler passen.
- Gebruik platen die worden aanbevolen door de fabrikant van de thermocycler.

Afdekfolie aanbrengen op en verwijderen van de plaat

- Dicht de platen altijd af met een nieuwe klevende plaatafdichting. Afdichtingen mogen niet worden hergebruikt.
- Breng de klevende afdekfolie aan op de plaat met een afsluitwig of sealroller om de plaat goed af te dichten.
- Dicht de 96-wells plaat altijd af met een nieuwe klevende plaatafdichting voordat u verder gaat naar de volgende stappen in het protocol.
  - Stappen voor schudden van de plaat
  - Stappen voor centrifugeren

- Thermocyclingstappen
- Hybridisaties
- Langdurige opslag
- Zorg dat de randen en wells zijn afgedicht om het risico op kruisverontreiniging en evaporatie te verkleinen.
- Plaats de plaat op een vlakke ondergrond alvorens de afdekfolie voorzichtig te verwijderen.
- Als er vloeistof of condensatie te zien is op de afdichting of zijwanden van de plaatwells, moet de plaat voor het verwijderen van de folie gedurende 1 minuut op 280 x g worden gecentrifugeerd.
- Gebruik klevende plaatafdichtingen die effectief zijn bij -40 °C tot 110 °C en die geschikt zijn voor volledig of gedeeltelijk omrande PCR-platen.

Apparatuur

- Zorg dat de laboratoriummedewerkers bekend zijn met de instructies van de fabrikant voor het gebruik en onderhoud van alle apparatuur voordat wordt gestart met de assay.

Plaattype en plaatoverdrachten

- Het juiste plaattype is vereist voor optimale assayprestaties en opslag.
- Breng bij overdracht van volumes tussen platen het gespecificeerde volume over van elke well van een plaat naar de overeenkomende well van de bestemmingsplaat.
- Meerkanaals pipetten kunnen worden gebruikt bij het overbrengen van monsters tussen buisjesstrips of platen.
- Gebruik de volgende richtlijnen bij het schudden van platen.
  - Gebruik een plaatschudder om platen te schudden. Platen mogen niet worden gevortext.
  - Schud PCR-platen bij 1200 tpm.
  - Schud MIDI-platen bij 1800 tpm.
  - Volg de instructies van de fabrikant om er zeker van te zijn dat de plaat goed in de plaatschudder zit.

Centrifugeren

- Wanneer de instructies in het protocol aangeven dat er kort moet worden gecentrifugeerd, centrifugeer dan gedurende 1 minuut op 280 × g.
- Als er vloeistof op de afdichting of op de zijkanten van een well wordt waargenomen, centrifugeer de plaat dan gedurende 1 minuut op 280 × g.

Reagentia hanteren

- Doe de dop van reagensbuisjes er onmiddellijk na gebruik weer goed op om evaporatie te beperken en contaminatie te voorkomen.

- Breng de reagentia terug naar de gespecificeerde opslagtemperatuur als ze niet langer nodig zijn voor een procedure.
- Volg de reagensbereiding die voorafgaat aan elke procedureparagraaf in de *Gebruiksaanwijzing* op pagina 35.
- Zorg dat u de vereiste volumes mastermengsel, elutiemengsel en 80% ethanol bereid voor het aantal monsters dat u gaat verwerken.
- De volumes in de tabellen voor mastermengsels en oplossingen bevatten overschotten. Berekeningen voor volumeoverschotten zijn als volgt.
  - Tabel 13
    - Volume FSM = (7,2 µl) x (aantal monsters + controles) x (1,25).
    - Volume RVT = (0,8 µl) x (aantal monsters + controles) x (1,25).
  - Tabel 19
    - Volume ERA1-B = (7,2 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,20).
    - Volume ERA1-A = (2,8 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,20).
  - Tabel 26
    - Volume EE2 = (20,9 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,364).
    - Volume HP3 = (1,1 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,364).
  - Tabel 27
    - Volume EE2 = (20,9 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,364).
    - Volume HP3 = (1,1 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,364).
  - Tabel 32
    - Volume LNA1 = (38,1 µl) x (aantal bibliotheken) x (2,0).
    - Volume LNB1 = (6,9 µl) x (aantal bibliotheken) x (2,0).
  - Tabel 33
    - Volume EE2 = (30,4 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,25).
    - Volume HP3 = (1,6 µl) x (aantal bibliotheken) x (1,25).

Adaptersets

- De TSO Comprehensive (EU)-assay omvat UMI-adapters en SUA1-adapters.
- SUA1-adapters zijn voor gebruik bij RNA-monsters, niet bij DNA.
- UMI-adapters zijn voor gebruik bij DNA-monsters, niet bij RNA.

Parels hanteren

- Er zitten drie soorten parels in de TSO Comprehensive (EU)-assay (SPB, SMB en LNB1). Zorg dat het juiste pareltype wordt gebruikt tijdens de procedure.
- Voer het juiste aantal wassingen voor elk pareltype uit.
- Zorg dat de parels voor gebruik op kamertemperatuur zijn.
- Meng de parels 1 minuut voor gebruik om homogeniteit te garanderen.
- Gebruik de volgende richtlijnen bij het mengen van parels met een pipet.
  - Gebruik een geschikte pipet en tipgrootte voor het volume dat u mengt.
  - Pas de volume-instelling aan tot ongeveer 50–75% van het monstervolume.
  - Pipetteer langzaam zonder de plunjer los te laten.
  - Vermijd spatten en het introduceren van luchtbellen.
  - Positioneer de pipettip boven het pellet en dispenseer direct in het pellet om de parels uit de well of het buisje te halen.
  - Zorg dat het parelpellet volledig ondergedompeld is in de oplossing. De oplossing moet er donkerbruin uitzien en een homogene consistentie hebben.
  - Controleer of er een korrel aanwezig is. Zuig de totale korreloplossing van de well voorzichtig op in de punt en bekijk de bodem van de wells.
- Als parels in de pipettips worden geaspireerd tijdens de stappen voor magnetische scheiding, dispenseer de parels dan terug op de plaatwell op de magnetische standaard. Wacht tot de vloeistof helder is (ongeveer 2 minuten) voordat u verdergaat naar de volgende stap van de procedure.
- Bij het wassen van parels:
  - Gebruik de aanbevolen magnetische standaard voor de plaat.
  - Dispenseer vloeistof rechtstreeks op het parelpellet, zodat parels aan de zijkant van de wells ook nat worden.
  - Houd de plaat op de magnetische standaard tot in de procedure wordt aangegeven dat deze moet worden verwijderd.
  - Beweeg de plaat niet terwijl deze op de magnetische standaard staat.
  - Verstoor het parelpellet niet terwijl het zich op de magnetische standaard bevindt.
- Breng de pipettips bij het wassen van parels of het verwijderen van supernatans in een hoek aan op de bodem van de wells om te voorkomen dat een vacuüm wordt gecreëerd en oplossing in de pipettipfilters wordt gezogen.

Labtraceringsformulier

- Het *Labtraceringsformulier voor TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documentnr. 200009022)* biedt een controlelijst voor de protocolstappen.

Aantal bibliotheken en indexen selecteren

Plan voorafgaand aan het instellen van de run het aantal monsterbibliotheken en monsterindexen voor de sequencing-run. De volgende richtlijnen voor monsteraantallen omvatten positieve controles, maar bevatten geen amplificatiereagenscontroles ('no-template controls', NTC). NTC's kunnen echter aan de stroomcel worden toegevoegd als aanvullend monster.

Neem de volgende richtlijn in overweging voor het bepalen van het aantal bibliotheken dat wordt gesequencet op één stroomcel.

Tabel 5 RNA- of DNA-bibliotheken voor TSO Comprehensive (EU)

Bibliotheektype	Minimum*	Maximum
RNA	3	16
DNA	3	8

Sequence voor optimaal gebruik van reagens bij het sequencen van TSO Comprehensive (EU) op het NextSeq 550Dx-instrument 8 RNA bibliotheken en 8 DNA-bibliotheken.

Tabel 6 RNA- en DNA-bibliotheken gecombineerd voor TSO Comprehensive (EU)

Aantal DNA bibliotheken	Aantal RNA bibliotheken
8	8

Voeg tijdens de bibliotheekpreparatie de indexprimer toe aan elke monsterbibliotheek. ***Gebruik een ander indexprimermengsel voor elke monsterbibliotheek.*** Indexprimers identificeren op unieke wijze elke monster, zodat bibliotheken met elkaar gepoold kunnen worden voor sequencen op één stroomcel. (Compatibele indexcombinaties worden tijdens het instellen in de Local Run Manager-software weergegeven op het scherm 'Create Run'.)

Zorg dat de indexprimers die u met monsters gebruikt, overeenkomen met de indexen die u selecteert voor analyse met Local Run Manager. ***Verkeerde combinaties veroorzaken onjuiste resultaatrapportage vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie.***

Er zijn twee indextypes in de TSO Comprehensive (EU) Kit.

- **UPxx-indexen:** Gebruik UPxx-indexen voor bibliotheken afgeleid van RNA- of DNA-monsters.
- **CPxx-indexen:** Gebruik CPxx-indexen voor bibliotheken afgeleid van DNA-monsters. Gebruik geen CPxx-indexen voor bibliotheken afgeleid van RNA-monsters of als er in totaal drie DNA-bibliotheken worden gesequencet.

Bij het sequencen van slechts drie bibliotheken is het volgende vereist.

- Bibliotheken moeten allemaal DNA of allemaal RNA zijn.
- Gebruik geen CPxx-indexsets.
- Een van de volgende UPxx-indexsets is vereist voor het leveren van voldoende diversiteit.

- UP01, UP02 en UP03
- UP04, UP05 en UP06
- UP07, UP08 en UP09
- UP10, UP11 en UP12

Bijvoorbeeld, de eerste bibliotheek wordt toegewezen aan UP01, de tweede bibliotheek aan UP02 en de derde bibliotheek aan UP03.

TruSight Oncology-controles

Voor TSO Comprehensive (EU) is het gebruik van de TruSight Oncology Controls verplicht; deze bestaan uit de TruSight Oncology DNA Control en de TruSight Oncology RNA Control als positieve controles. Neem voor elke DNA-sequencing-run de TruSight Oncology DNA Control en voor elke RNA-sequencing-run de TruSight Oncology RNA Control op in een bepaalde bibliotheekpreparatiecyclus (ook voor gecombineerde DNA- en RNA-runs). Voor elke geplande gesequencete run wordt een unieke positieve controle voorbereid.

Voeg één amplificatiereagenscontrole ('no-template control', NTC) toe aan elke RNA- en elke DNA-bibliotheekpreparatiecyclus. De NTC wordt herhaaldelijk gesequencet in één bibliotheekpreparatiecyclus. Volg de richtlijnen hieronder voor de TruSight Oncology Controls.

- Verwerk positieve controles en amplificatiereagenscontroles precies zo als monsters.
- Gebruik TEB voor de DNA NTC.
- Gebruik DNase/RNase-vrij water voor de RNA NTC.
- De positieve controles worden meegenomen in de maximale bibliotheekvereiste.
- De NTC's worden niet meegenomen in de minimale bibliotheekvereiste.
- Gebruik UP-indexen voor de NTC bij sequencing van 3 bibliotheken.
- Als de NTC herhaaldelijk wordt gesequencet, kunnen de indexen die zijn geselecteerd voor deze controle niet worden herhaald in de bibliotheekpreparatiecyclus.

In de onderstaande tabellen staan voorbeelden van plaatlay-outs voor bibliotheekpreparatie. Elke genummerde kolom vertegenwoordigt één sequencing-run. Wanneer DNA- en RNA-bibliotheken samen gesequencet worden, vertegenwoordigt elke overeenkomende set kolommen één sequencing-run (bijv. kolom 1 en kolom 7). De NTC wordt gesequencet voor elke kolom of set kolommen.

Tabel 7 Bibliotheekpreparatiecyclus van een enkele run met zes patiëntmonsters

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos DNA-controle	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	Pos RNA-controle
B	DNA 1	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA 1
C	DNA 2	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA 2
D	DNA 3	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA 3
E	DNA 4	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA 4
F	DNA 5	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA 5
G	DNA 6	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA 6
H	DNA NTC	leeg	leeg	leeg	leeg	leeg	RNA NTC

Tabel 8 Bibliotheekpreparatiecyclus van drie runs met 20 patiëntmonsters

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

Gebruiksaanwijzing

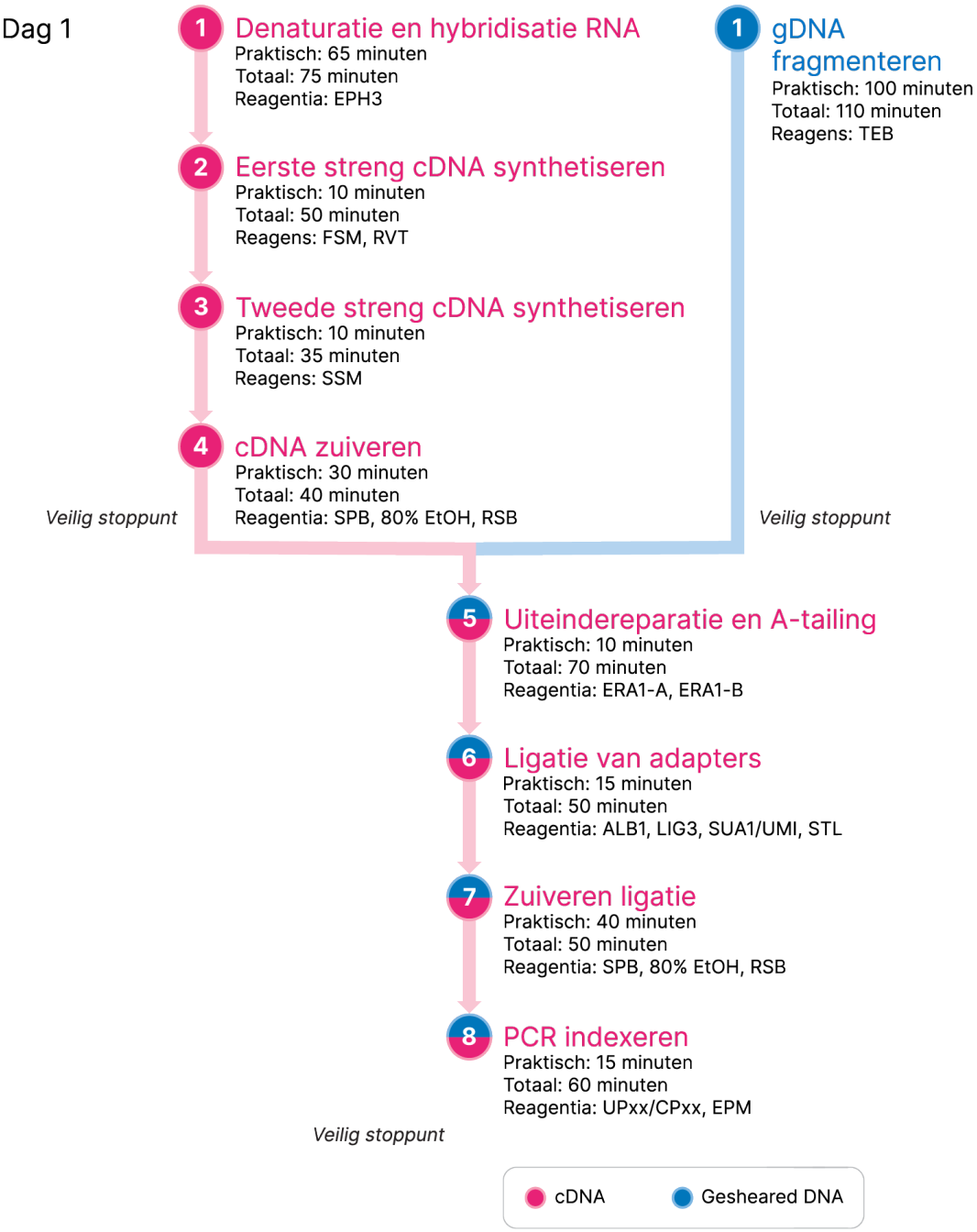
Een overzicht van de workflow van de TSO Comprehensive (EU) wordt weergegeven in Afbeelding 1 en Afbeelding 2.

Workflow voor bibliotheekpreparatie

Afbeelding 1 toont de bibliotheekvoorbereidingsworkflow voor de TSO Comprehensive (EU)-assay. Bibliotheken van RNA- en DNA-monsters kunnen gelijktijdig in afzonderlijke wells worden geprepareerd. Positieve controles en amplificatiereagenscontroles worden precies zo als monsters verwerkt. De veilige stoppunten zijn gemarkeerd tussen de stappen.

Voordat u het protocol start, voert u de run- en monsterinformatie in op een v2-monsterblad voor gebruik met de Local Run Manager-software. Zie *Runinformatie invoeren* op pagina 40.

Afbeelding 1 TSO Comprehensive (EU)-workflow (deel 1)



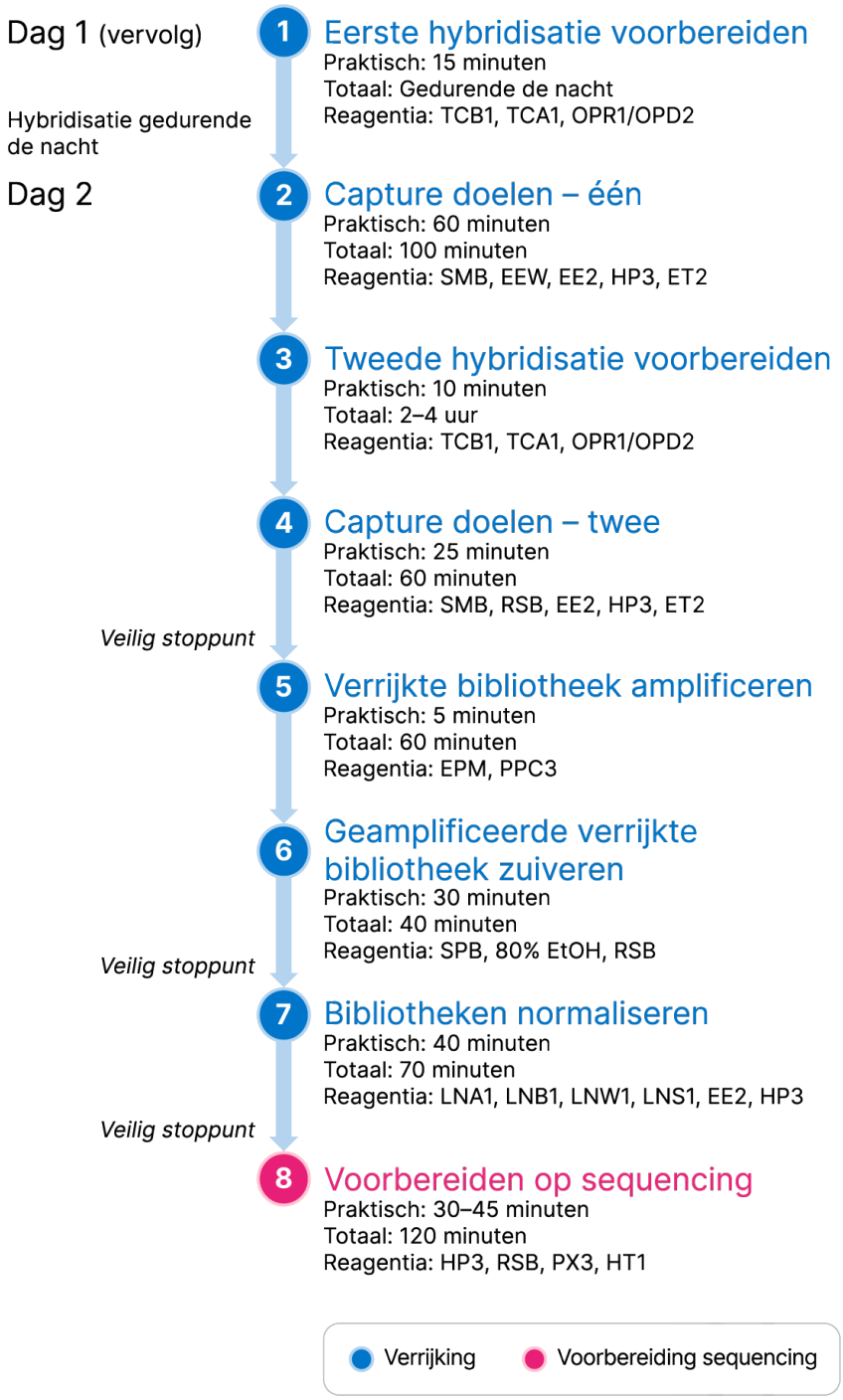
* De praktische en totale tijdsduren zijn een schatting.

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Verrijkingsworkflow

Afbeelding 2 laat de workflow voor verrijking van de TSO Comprehensive (EU)-assay zien. Veilige stoppunten gemarkeerd tussen de stappen.

Afbeelding 2 TSO Comprehensive (EU)-workflow (deel 2)



BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Thermocyclers programmeren

Sla voordat u begint met de assay de volgende programma's op thermocyclers voor pre-amplificatie en post-amplificatie op.

Tabel 9 Thermocyclerprogramma's voor pre-amplificatie

Procedurestap	Programmanaam	Deksel-temperatuur	Reactie-volume	Thermocycler-parameters
Denaturatie en hybridisatie RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C gedurende 5 minuten • 4 °C gedurende 1 minuut • 4 °C vasthouden
Eerste streng cDNA synthetiseren	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C gedurende 10 minuten • 42 °C gedurende 15 minuten • 70 °C gedurende 15 minuten • 4 °C gedurende 1 minuut • 4 °C vasthouden
Tweede streng cDNA synthetiseren	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C gedurende 25 minuten • 4 °C gedurende 1 minuut • 4 °C vasthouden

OPMERKING Als de dekseltemperatuur voor 2ndSS niet kan worden ingesteld op 30 °C, moet de optie voor voorverwarmd deksel worden uitgeschakeld.

Tabel 10 Thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie

Procedurestap	Programmanaam	Deksel-temperatuur	Reactie-volume	Thermocycler-parameters

PCR indexeren	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C gedurende 30 seconden
				• 15 cycli van:
				  • 98 °C gedurende 10 seconden
				  • 60 °C gedurende 30 seconden
				  • 72 °C gedurende 30 seconden
				• 72 °C gedurende 5 minuten
				• 10 °C vasthouden

Eerste hybridisatie uitvoeren	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C gedurende 10 minuten • 85 °C gedurende 2 min 30 seconden • 75 °C gedurende 2 min 30 seconden • 65 °C gedurende 2 min en 30 seconden • 57 °C aanhouden gedurende 8 tot 24 uur
Tweede hybridisatie uitvoeren	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C gedurende 10 minuten • 85 °C gedurende 2 min 30 seconden • 75 °C gedurende 2 min 30 seconden • 65 °C gedurende 2 min 30 seconden • 57 °C aanhouden gedurende 1,5 tot 4 uur

Verrijkte bibliotheek amplificeren	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C gedurende 30 s
				• 18 cycli van:
				  • 98 °C gedurende 10 s
				  • 60 °C gedurende 30 s
				  • 72 °C gedurende 30 s
				• 72 °C gedurende 5 min
				• 10 °C vasthouden

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Runinformatie invoeren

NextSeq 550Dx instrument ;Local Run Manager is de software die wordt gebruikt voor het opzetten van TSO Comprehensive (EU)-assayruns. Raadpleeg voor meer informatie de *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodule (documentnr. 200008661)*.

Voer informatie over de run- en monsterinstellingen rechtstreeks in de TSO Comprehensive (EU)-analysemodule in.

Runparameters instellen

1. Log in bij Local Run Manager op het instrument of vanaf een netwerkcomputer.
2. Selecteer **Create Run** en daarna **TSO Comp (EU)**.
3. Voer een runnaam in die de run van sequencing tot en met analyse identificeert. De naam moet voldoen aan de volgende criteria.
   - 1–40 tekens.
   - Alleen alfanumerieke tekens, underscores (lage streepjes) of koppeltekens.
   - Underscores en koppeltekens moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.
   - Uniek bij alle runs op het instrument.
4. [Optioneel] Voer een runbeschrijving in om de run te helpen identificeren en gebruik daarbij de volgende criteria.
   - 1–150 tekens.
   - Alleen alfanumerieke tekens of spaties.
   - Spaties moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.

Monsters voor de run specificeren

Specificeer monsters voor de run op een van de volgende manieren.

- **Monsters handmatig invoeren:** gebruik de lege tabel in het scherm Create Run. Raadpleeg *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32 voor alle ondersteunde monsterconfiguraties.
- **Monsters importeren:** navigeer naar een extern bestand met een kommagescheiden (`*.csv`) indeling. In het scherm Create Run kan een sjabloon worden gedownload.

LET OP

Verkeerde combinaties tussen de monsters en indexprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportage als gevolg van verlies van positieve monsteridentificatie. Voer monster-ID's in en wijs indexen toe in Local Run Manager voordat u met de bibliotheekpreparatie begint. Registreer ter referentie monster-ID's, indexen en plaats van de plaatwells tijdens de bibliotheekpreparatie.

LET OP

Controleer, om gegevensverlies te voorkomen, of er geen installatie van een kennisbank gaande is voordat een run wordt opgeslagen.

Monsters handmatig invoeren

1. Voer een unieke monster-ID in in het veld Sample ID en pas daarbij de volgende criteria toe. **Alle controlemonsters moeten eerst worden toegevoegd.** Raadpleeg *Controlemonsters* op pagina 42 voor meer informatie.
   - 1–25 tekens.
   - Alleen alfanumerieke tekens, underscores (lage streepjes) of koppeltekens.
   - Underscores en koppeltekens moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.
2. [Optioneel] Voer in het veld Sample Description een monsterbeschrijving in en pas daarbij de volgende criteria toe.
   - 1–50 tekens.
   - Alleen alfanumerieke tekens, koppeltekens, underscores of spaties.
   - Spaties, underscores en koppelstreepjes moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.
3. Selecteer een index voor de DNA bibliotheek en/of RNA-bibliotheek die uit het monster is bereid.
   Zorg dat RNA en DNA monsters in afzonderlijke kolommen staan.
   Het veld DNA i7+i5 Sequence wordt automatisch ingevuld nadat een DNA-index-ID is geselecteerd. Het veld RNA i7+i5 Sequence wordt automatisch ingevuld nadat een RNA-index-ID is geselecteerd.
   Raadpleeg behalve de samenvatting hier *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32 voor het selecteren van de index-ID.
   - Voor een DNA-bibliotheek selecteert u een unieke index-ID (UPxx- of CPxx-indexen) in de vervolgkeuzelijst DNA Index ID.
   - Voor een RNA-bibliotheek selecteert u een unieke index-ID (alleen UPxx) in de vervolgkeuzelijst RNA Index ID.
   - Volg als er in totaal drie bibliotheken in de run zitten de richtlijnen voor indexselectie in *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32.
4. Wijs met behulp van het veld Tumor Type een tumortype toe voor elk monster, en selecteer daarbij het meest specifieke tumortype dat beschikbaar is. Raadpleeg *Een tumortype selecteren* op pagina 43.

5. Wijs met behulp van het veld Tumor Type voor elke controle een van de volgende controletypen toe. Raadpleeg *Controlemonsters* op pagina 42.
   - DNA External Control
   - RNA External Control
   - DNA No-Template Control
   - RNA No-Template Control

   Bij gebruik van de TruSight Oncology DNA Control is het type controle DNA External Control. Bij gebruik van de TruSight Oncology RNA Control is het type controle RNA External Control.
6. Wijs het geslacht toe.
7. [Optioneel] Selecteer **Export to CSV** om monsterinformatie naar een extern bestand te exporteren.
8. Controleer de informatie op het scherm Create Run.
   Onjuiste informatie kan de resultaten beïnvloeden.
9. Selecteer **Save Run**.

Monsters importeren

1. Selecteer **Import CSV** en blader naar de locatie van het monsterinformatiebestand. U kunt twee soorten bestanden importeren.
   - Selecteer **Download CSV** op het scherm Create Run om een nieuw monsterinformatiesjabloon te downloaden. Het CSV-bestand bevat de vereiste kolomkoppen en de vereiste opmaak om te importeren. Voer in elke kolom monsterinformatie in voor de monsters in de run. Voer in de kolom Tumor Type de tumortypeterm of de code ervan in (raadpleeg *Tumortypes downloaden* op pagina 45). Met het veld Tumor Type kunnen ook monsters als controles worden toegewezen (raadpleeg *Controlemonsters* op pagina 42).
   - Gebruik een bestand met monsterinformatie dat is geëxporteerd uit de Local Run Manager met behulp van de functie Export to CSV.
2. Controleer de geïmporteerde informatie op het scherm Create Run.
   Onjuiste informatie kan de resultaten beïnvloeden.
3. [Optioneel] Selecteer **Export to CSV** om monsterinformatie naar een extern bestand te exporteren.
4. Selecteer **Save Run**.

Controlemonsters

TSO Comprehensive (EU) vereist het gebruik van TruSight Oncology Controls. Door een monster toe te wijzen als controle wordt Sex van het monster automatisch op Unknown gezet. Als u een monster als controle wilt gebruiken, selecteert u een van de vier controletypen in het veld Tumor Type:

- DNA External Control (positieve DNA-controle)
- DNA No-Template Control

- RNA External Control (positieve RNA-controle)
- RNA No-Template Control

Raadpleeg *Een tumortype selecteren* op pagina 43 voor meer informatie over het instellen van tumortypes voor alle soorten monsters tijdens het instellen van een run.

Binnen een run mag er van elk controletype slechts één worden gespecificeerd. Voor een DNA External Control of een DNA No-Template Control mag alleen een DNA-bibliotheek worden gespecificeerd. Voor een RNA External Control of een RNA No-Template Control mag alleen een RNA-bibliotheek worden gespecificeerd. DNA of RNA No-Template Controls worden niet meegeteld voor het maximale aantal bibliotheken in een run.

Een tumortype selecteren

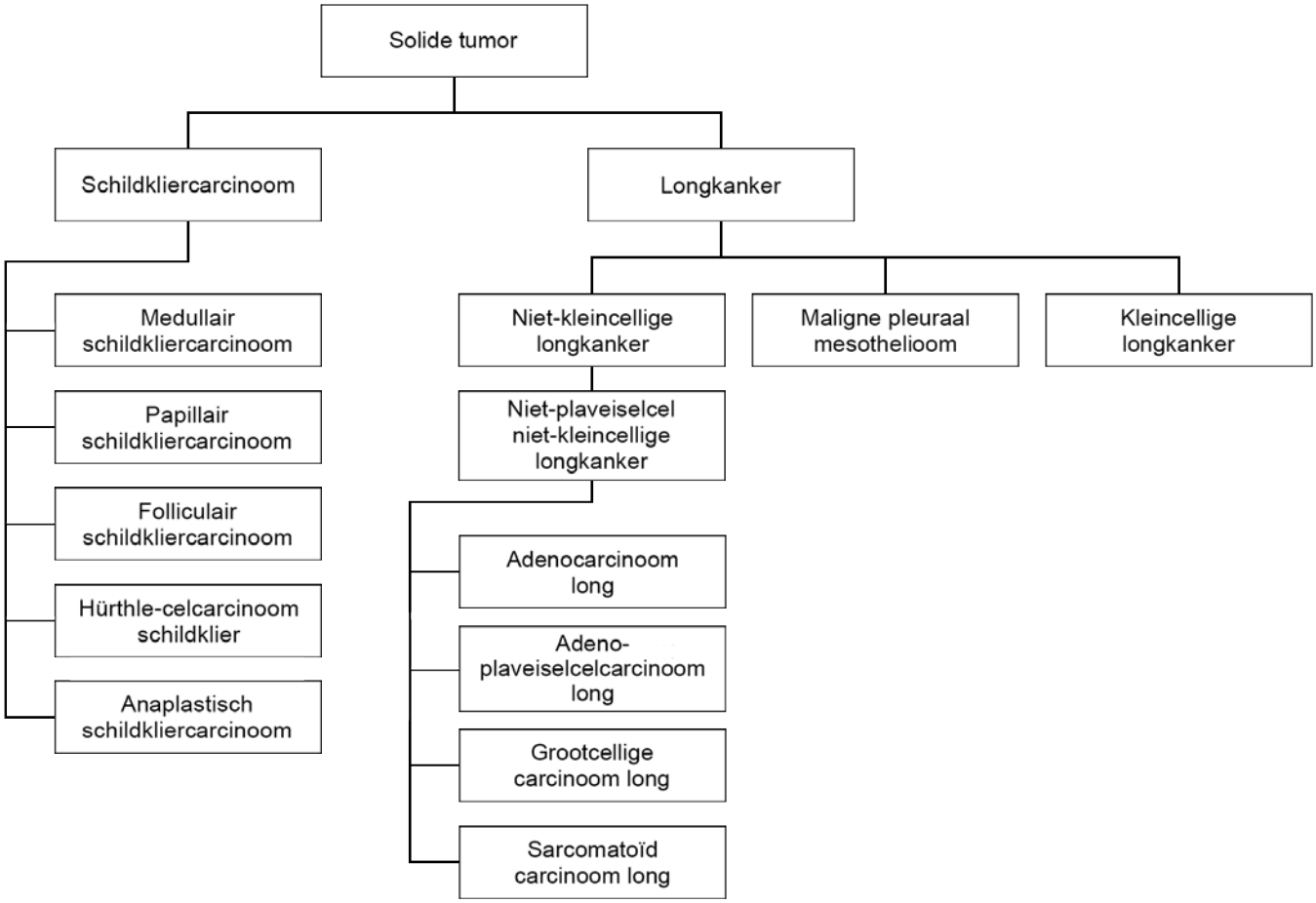
Voor elk monster moet een tumortype worden gespecificeerd. Met uitzondering van controletypen zijn de beschikbare tumortypen afgeleid van de geïnstalleerde kennisbank en kunnen deze veranderen met bijgewerkte versies van de kennisbank.

LET OP

Een onjuiste selectie van het tumortype kan onjuiste resultaten veroorzaken. Handel eventuele waarschuwingen die verschijnen bij het specificeren van de tumortypes af om analysefouten te voorkomen.

De tumortypetermen maken deel uit van een hiërarchische ziekte-ontologie in de KB, die is opgemaakt als een set ouder/kind-relaties. De term niet-kleincellige longkanker is bijvoorbeeld een kind van longkanker, aangezien niet-kleincellige longkanker een soort longkanker is. Afbeelding 3 laat een subset van een voorbeeldziekte-ontologie zien, waarbij 'Solide tumor' wordt getoond als de grondterm, plus de termen die worden geassocieerd met longkanker en schildklierkanker (andere tumortypen worden niet getoond). Een term die via de ouder/kind-relaties verbonden is met lager liggende termen wordt een voorouder genoemd. De gekoppelde lager liggende termen zijn afstammelingen van de voorouderterm. Longkanker is bijvoorbeeld een voorouder van adenocarcinoom van de long en kleincellige longkanker, en medullair schildkliercarcinoom is een afstammeling van zowel schildkliercarcinoom als solide tumor.

Afbeelding 3 Subset van een voorbeeldziekte-ontologie



Het geselecteerde tumortype voor een patiëntmonster heeft invloed op:

- Welke voor begeleidende diagnostiek beoogde gebruiken worden geëvalueerd voor het monster. Alleen patiëntmonsters met een tumortype dat een exacte match met of een afstammeling is van het tumortype voor een voor begeleidende diagnostiek beoogd gebruik zullen worden geëvalueerd voor die claim.
- Welke tumorprofilerende varianten worden opgenomen in het TSO Comprehensive (EU)-rapport.

De volgende instructies beschrijven het proces voor het selecteren van een tumortype via het scherm Create Run. Het tumortype kan ook worden ingesteld door een csv-bestand te importeren dat een tumortype bevat (raadpleeg *Monsters importeren* op pagina 42).

1. De beschikbare tumortypen zijn weer te geven door te dubbelklikken in de cel Tumor Type in de rij voor het monster. De beschikbare tumortypen worden in een alfabetisch gerangschikte hiërarchische lijst weergegeven.
   Met het veld Tumor Type kan ook een controletype voor controlemonsters worden toegewezen (raadpleeg *Controlemonsters* op pagina 42).
2. Zoek en selecteer het gewenste tumortype door de lijst te gebruiken of met behulp van de zoekbalk bovenin het scherm Tumor Type.

Tumortypes downloaden

Een volledige lijst van beschikbare tumortypen in TSV-indeling kan worden gedownload via het scherm Create Run met de knop **Download Tumor Types TSV**. De lijst bevat de volgende informatie:

- De term tumortype die zichtbaar is in de gebruikersinterface.
- Het volledige pad van het tumortype binnen de tumortypenhiërarchie (ziekte-ontologie).
- De code waarmee de Local Run Manager het tumortype identificeert.

Voorbereiden op protocolstappen

1. Ontsmet de werkgebieden grondig met een RNase/DNase-remmend reinigingsmiddel.

   LET OP

   Alle procedures in de workflow vereisen een RNase/DNase-vrije omgeving.

2. Stel de thermocyclerprogramma's voorafgaand aan de amplificatie in. Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
3. Volg de instructies van de fabrikant om de ultrasonicator in te stellen.
4. Ga bij het verwerken van alleen DNA-monsters direct verder naar *gDNA fragmenteren* op pagina 50.
5. Verwijder de RNA controles uit de opslag.
6. Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 11 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (onderdeelnr. 20031127)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
EPH3	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Denaturatie en hybridisatie RNA
FSM	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste streng cDNA synthetiseren
RVT	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Eerste streng cDNA synthetiseren
SSM	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede streng cDNA synthetiseren

Tabel 12 TruSight Oncology Comp Library Prep (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	cDNA zuiveren
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	cDNA zuiveren

Denaturatie en hybridisatie RNA

Bij dit proces wordt gezuiverd RNA gedenatureerd en geprimed met willekeurige hexameren in voorbereiding op cDNA-synthese.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - EPH3: Zet opzij.
   - FSM: Vortex om te mengen. Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Inspecteer op bezinksel. Indien aanwezig, pipetteren om te mengen tot het bezinksel is opgelost.
   - RVT: Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Bewaar op ijs.

OPMERKING RVT is een viskeuze oplossing. Pipetteer altijd langzaam om de vorming van luchtbellen te voorkomen.

2. Combineer de volgende volumes in een microcentrifugebuisje om een FSM+RVT-mastermengsel te bereiden:

   Tabel 13 FSM+RVT-mastermengsel

Mastermengselcomponent	4 RNA-monsters (µl)	8 RNA-monsters (µl)	16 RNA-monsters (µl)	24 RNA-monsters (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

   Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg *Reagentia hanteren* op pagina 29 voor berekeningen.

3. Pipetteer tien keer om te mengen.
4. Plaats het FSM+RVT-mastermengel op ijs tot *Eerste streng cDNA synthetiseren* op pagina 47.

Procedure

1. Ontdooi de geëxtraheerde RNA-monsters en RNA-controles op ijs.
   Verwerk de RNA-controles als monsters voor de rest van het protocol.
2. Bewaar RNA op ijs als het niet wordt gebruikt. Raadpleeg *Weefselvereisten* op pagina 23 om monsters te kwantificeren.
3. Pipetteer elk RNA-monster 10 keer om te mengen.
4. Gebruik RNase/DNase-vrij water om 40 ng van elk RNA-monster te bereiden tot een definitief volume van 8,5 µl (4,7 ng/µl).
   Gebruik voor RNA-controles de concentratie die staat vermeld in de buisjestabel.
5. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'CF' (cDNA-fragmenten).
6. Voeg 8,5 µl van elk RNA-monster toe aan een unieke well van de CF PCR-plaat.

7. Zorg dat de plaatlay-out en indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland in Local Run Manager tijdens het instellen van de run.
8. Vortex EPH3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Voeg 8,5 µl EPH3 toe aan elke monsterwell.
10. Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR plaat.

LET OP

Zorg dat de randen en wells volledig zijn afgedicht om evaporatie te voorkomen.

11. Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
12. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
13. Plaats op de thermocycler en voer het LQ-RNA-programma uit.
    Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
14. Wanneer het monster 4 °C bereikt, dit 1 minuut vasthouden en vervolgens onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

Eerste streng cDNA synthetiseren

Bij dit proces worden de RNA-fragmenten die zijn geprimed met willekeurige hexameren omgezet in de eerste streng cDNA aan de hand van reverse-transcriptase.

Procedure

1. Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Pipetteer 5 keer om het FSM+RVT-mastermengsel te mengen.
3. Voeg 8 µl FSM+RVT-mastermengsel toe aan elke monsterwell.
4. Pipetteer 5 keer om te mengen.
5. Gooi resterend FSM+RVT-mastermengsel weg.
6. Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
7. Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
8. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
9. Plaats op een thermocycler en voer het 1stSS-programma uit.
   Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
10. Wanneer de monsters 4 °C bereiken, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.
    De monster van de eerste streng kunnen maximaal 5 minuten worden bewaard bij 4 °C.

Tweede streng cDNA synthetiseren

Bij dit proces wordt het RNA-sjabloon verwijderd en het dubbelstrengse cDNA gesynthetiseerd.

Voorbereiden

1. Bereid het volgende reagens voor.
   - SSM: Inverteer 10 keer om te mengen. Centrifugeer kort.

Procedure

1. Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Voeg 25 µl SSM toe aan elke monsterwell.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
4. Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
5. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
6. Plaats op een thermocycler en voer het 2ndSS-programma uit.
   Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
7. Wanneer het monster 4 °C bereikt, dit 1 minuut vasthouden en vervolgens onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

cDNA zuiveren

Bij dit proces wordt gebruikgemaakt van SPB om de cDNA te zuiveren van ongewenste reactiecomponenten. De parels worden tweemaal gewassen met verse 80% ethanol. De cDNA word geëlueerd met RSB.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - SPB: Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
   - RSB: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Bereid verse 80% EtOH in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

Reagens	3 monsters	8 monsters	16 monsters	24 monsters
100% ethanolalcohol, puur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-vrij water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
4. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat als 'BIND1' (cDNA-binding).
5. Dek af en zet opzij.
6. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
3. Voeg onmiddellijk 90 µl SPB toe aan elke monsterwell van de BIND1 MIDI-plaat.
   Als een bak wordt gebruikt om SPB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,05 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SPB is toegevoegd aan elke monsterwell.
4. Breng het volledige volume (50 µl) van elk monster over van de CF PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BIND1 MIDI-plaat.
5. Gooi de lege CF PCR plaat weg.
6. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND1 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
7. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
8. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
9. Plaats de BIND1 MIDI-plaat gedurende 5 minuten op een magnetische standaard.
10. Gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen uit elke monsterwell zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

Wassen

1. Was de parels als volgt:
   a. Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke well.
   b. Wacht 30 seconden.
   c. Verwijder alle supernatans uit de wells en gooi dit weg.
2. Was de parels een ***tweede*** keer.
3. Verwijder resterend EtOH uit elke well.
   Gebruik een P20-pipet met fijne tips.
4. Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

1. Verwijder de BIND1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
3. Voeg 22 µl RSB toe aan elke monsterwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND1 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.

5. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
6. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'PCF' ('Purified cDNA Fragments', gezuiverde cDNA-fragmenten).
   Gebruik een PCR-plaat als u stopt bij het *VEILIG STOPPUNT* op pagina 50.
9. Breng 20 µl eluaat over van elke monsterwell van de BIND1 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de PCF-plaat.
10. Gooi de lege BIND1 MIDI-plaat weg.
11. Voeg 30 µl RSB toe aan elke monsterwell van de PCF-plaat.
12. Pipetteer 10 keer om te mengen.
13. Breng klevende plaatafdichting aan op de PCF-plaat en bewaar deze op ijs.
14. Breng de EPH3, FSM, RVT en SSM terug naar de opslag.
15. Als u alleen monsters verwerkt die zijn afgeleid van RNA (cDNA) en niet stopt bij het veilige stoppunt, ga dan door naar *Uiteindereparatie en A-tailing* op pagina 53.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de PCF PCR plaat 1 minuut lang op 280 × g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 7 dagen.

Voorbereiden op protocolstappen

1. Verwijder de DNA controles uit de opslag.
2. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 14 TruSight Oncology Comp Library Prep (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TEB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	gDNA fragmenteren

gDNA fragmenteren

Bij dit proces wordt gDNA gefragmenteerd en dsDNA fragmenten gegenereerd met 3' of 5' overhangende uiteinden.

Voorbereiden

1. Volg de aanbevelingen in *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23 om monsters te kwantificeren.
2. Bereid het volgende reagens voor.
   - TEB: Inverteer of vortex om te mengen.

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Procedure

De plaat voorbereiden

1. Selecteer een van de volgende drie opties om de plaat voor te bereiden.
   - **Optie 1:** Verwerk gDNA-monsters tegelijkertijd met cDNA-monsters in de PCF MIDI-plaat.
     a. Label de PCF MIDI-plaat met LP (Library Preparation, bibliotheekpreparatie).
     b. Plaats op ijs en zet opzij voor gebruik bij *Gefragmenteerd DNA overbrengen* op pagina 52.
   - **Optie 2:** Verwerk gDNA-monsters tegelijkertijd met cDNA-monsters en de PCF PCR plaat is bevroren.
     a. Ontdooi de PCF PCR plaat tot kamertemperatuur.
     b. Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
     c. Pipetteer 10 keer om te mengen.
     d. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP' ('Library Preparation', bibliotheekpreparatie).
     e. Breng de volledige hoeveelheid van 50 µl van elk monster over van de PCF PCR plaat naar de overeenkomende well van de LP MIDI-plaat.
     f. Gooi de PCF PCR-plaat weg.
     g. Breng klevende plaatafdichting aan en plaats op ijs tot *Gefragmenteerd DNA overbrengen* op pagina 52.
   - **Optie 3:** Verwerk alleen gDNA-monsters.
     a. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP' ('Library Preparation', bibliotheekpreparatie).
     b. Gebruik een PCR plaat als u stopt bij het *VEILIG STOPPUNT* op pagina 52.
     c. Dek af en zet opzij voor gebruik bij *Gefragmenteerd DNA overbrengen* op pagina 52.

gDNA verdunnen

1. Ontdooi de gDNA-monsters en DNA controles bij kamertemperatuur.
   Verwerk de DNA-controles net als monsters voor de rest van het protocol.
2. Pipetteer elk gDNA-monster 10 keer om te mengen.
3. Centrifugeer het buisje kort om druppels te verzamelen.
4. Inverteer of vortex de TEB om te mengen.
5. Gebruik TEB om elk gDNA-monster voor te bereiden in een uiteindelijk volume van 52 µl (0,77 ng/µl). Zie de volgende tabel voor invoerhoeveelheden en minimumconcentraties op basis van het type monster. De test vereist een minimale extractieconcentratie om minimaal 40 µl TEB van het volume van 52 µl mogelijk te maken. Gebruik voor DNA-controles de concentratie die op het label van het buisje staat vermeld. Pipetteer om monsterverlies te voorkomen niet minder dan 2 µl monster in deze verdunning.

Monstertype	Invoerhoeveelheid (ng)	Minimumconcentatie (ng/µl)
FFPE	40	3,33

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Fragmenteren

1. Voeg 52 µl van elk gDNA-monster toe aan een afzonderlijke well van het ultrasonicatorbuisje.

   LET OP

   Doe de gDNA langzaam in het buisje en zorg er daarbij voor dat er geen bellen in het buisje zitten en dat er geen luchtholtes onderaan het buisje zitten. Raadpleeg voor meer informatie *Assay* op pagina 26 en de instructies van de fabrikant.

2. Noteer de oriëntatie van de strip.
3. Fragmenteer gDNA met een ultrasonicator tot fragmenten.

Gefragmenteerd DNA overbrengen

1. Zorg dat de plaatlay-out en indexen voor elk monster overeenkomen met de run die u selecteert voor analyse met de TSO Comprehensive (EU)-analysemodule.
2. Volg de instructies van de fabrikant van de ultrasonicator om het monster te herstellen.
   Bij sommige buistypes voor de ultrasonicator kan centrifugeren nodig zijn om het monster in het buisje te consolideren.
3. Gebruik bij elk gefragmenteerd gDNA-monster een P20-pipet met fijne tips om drie overdrachten van 16,7 µl naar een lege well van de LP MIDI-plaat uit te voeren.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP MIDI-plaat.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt moet u klevende plaatafdichting aanbrengen op de LP PCR-plaat en deze 1 minuut lang centrifugeren op 280 × g. Bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 7 dagen.

Voorbereiden op protocolstappen

Zorg dat de thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie zijn ingesteld. Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.

1. Bereid een ijsemmer voor.
2. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 15 TruSight Oncology Comp Library Prep (invriezen) Box (onderdeelnr. 20031118)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
ERA1-A	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Uiteindereparatie en A-tailing
ERA1-B	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Uiteindereparatie en A-tailing

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
ALB1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
LIG3	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Ligatie van adapters
SUA1 (blauwe dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
UMI (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
STL	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
EPM	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	PCR indexeren

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (koel bewaren) Box (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Zuiveren ligatie
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Zuiveren ligatie

Tabel 17 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (onderdeelnr. 20031120)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
UPxx	-25 °C tot -15 °C	Ontdooi de betreffende indexprimerbuisjes tot kamertemperatuur.	PCR indexeren

Tabel 18 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (onderdeelnr. 20031126)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
CPxx	-25 °C tot -15 °C	Ontdooi de betreffende indexprimerbuisjes tot kamertemperatuur.	PCR indexeren

Uiteindereparatie en A-tailing

Dit proces repareert de overhangende uiteinden resulterend van fragmentatie tot uiteinden met overhangende A-tail door middel van een Uiteindereparatie en A-Tailing-mastermengsel (ERA1).

De 3' tot 5' exonucleaseactiviteit van dit mengsel verwijdert de overhangende uiteinden van 3' en de 5' tot 3' polymerase-activiteit vult de overhangende uiteinden van 5' in. De 3' uiteinden zijn tijdens deze reactie ge-A-tailed om te voorkomen dat ze aan elkaar ligeren tijdens de adapterligatiereactie.

Voorbereiden

1. Verwarm als volgt 2 micromonsterincubators voor met MIDI-verwarmingsblokinzetten.

- Verwarm een micromonsterincubator voor tot 30 °C.
- Verwarm een micromonsterincubator voor tot 72 °C.

2. Prepareer de volgende reagentia.
   - ERA1-A: Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Bewaar op ijs.
   - ERA1-B: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. Inspecteer op bezinksel. Verwarm het buisje, indien aanwezig, tot 37 °C en daarna pipetteren om te mengen tot het bezinksel is opgelost.
3. Bereid een ERA1-mastermengsel voor in een microcentrifugebuisje.

   Tabel 19 ERA1-mastermengsel

Mastermengsel-component	3 biblio-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

   Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg *Reagentia hanteren* op pagina 29 voor berekeningen.
4. Pipetteer langzaam 10 keer om te mengen, centrifugeer kort en plaats vervolgens het ERA1-mastermengsel op ijs.
5. Selecteer uit de volgende twee opties de geschikte optie om de plaat voor te bereiden.
   - **Optie 1:** Indien monsters in een MIDI-plaat zitten.

   a. Label de MIDI-plaat opnieuw, nu met 'LP2' ('Library Preparation 2', bibliotheekpreparatie 2).

   Wanneer sommige monsters in afzonderlijke MIDI platen zitten, moeten alle monsters naar afzonderlijke wells van dezelfde MIDI-plaat worden overgebracht volgens de plaatlay-out.
   - **Optie 2:** Indien de plaat bevroren is.

   a. Ontdooi de PCF PCR -plaat of de LP PCR-plaat tot kampertemperatuur.

   b. Centrifugeer de plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.

   c. Pipetteer 10 keer om te mengen.

   d. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP2' ('Library Preparation 2', bibliotheekpreparatie 2).

   e. Breng de volledige hoeveelheid van 50 µl van elk monster over van de PCF PCR -plaat of de LP PCR -plaat naar de overeenkomende well van de LP2 MIDI-plaat.

   f. Gooi de PCF PCR- of de LP PCR-plaat weg.

Procedure

1. Voeg 10 µl ERA1-mastermengsel toe aan elke monsterwell in de LP2 MIDI-plaat.
2. Gooi resterend ERA1-mastermengsel weg.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
4. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.

5. Incubeer in de voorverwarmde micromonsterincubator bij 30 °C gedurende 30 minuten.
6. Breng onmiddellijk over naar een tweede, voorverwarmde micromonsterincubator en incubeer bij 72 °C gedurende 20 minuten.
7. Plaats de LP2 MIDI-plaat op ijs gedurende 5 minuten.

Ligatie van adapters

In dit proces worden adapters geligeerd aan de uiteinden van de cDNA- en/of gDNA-fragmenten.

De TSO Comprehensive (EU)-assay omvat SUA1-adapters en UMI-adapters.

- Gebruik SUA1-adapters bij RNA -monsters.
- Gebruik UMI-adapters bij DNA-monsters.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - ALB1: Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - LIG3: Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Bewaar op ijs.
   - SUA1: Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - UMI: Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - STL: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.

Procedure

1. Haal de LP2 MIDI-plaat van het ijs.
2. Voeg 60 µl ALB1 toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat. Pipetteer daarbij langzaam.
3. Voeg 5 µl LIG3 toe aan elke monsterwell.
4. Voeg de adapters toe.
   Verschillende soorten adapters ***niet*** met elkaar combineren.
   - **RNA-monsterwells:** 10 µl SUA1 (blauwe dop) bij elk monster afgeleid van RNA.
   - **DNA-monsterwells:** 10 µl UMI (witte dop) bij elk monster afgeleid van DNA.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
7. Incubeer gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.
8. Vortex de STL om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Voeg 5 µl STL toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat.
10. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
    Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.

11. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.

Zuiveren ligatie

Bij dit proces wordt SPB gebruikt om de adaptergeligeerde cDNA- of gDNA-fragmenten te zuiveren en worden ongewenste producten verwijderd. De parels worden tweemaal gewassen met verse 80% ethanol. De adaptergeligeerde monsters worden geëlueerd met RSB.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - SPB: Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
   - RSB: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Bereid verse 80% EtOH in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

Reagens	3 biblio-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
100% ethanolalcohol, puur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-vrij water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
4. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
2. Voeg onmiddellijk 112 µl SPB toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat.
   Als een bak wordt gebruikt om SPB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,05 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SPB is toegevoegd aan elke monsterwell.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
4. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
5. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
6. Plaats de LP2 MIDI-plaat gedurende 10 minuten op de magnetische standaard.
7. Gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen uit elke monsterwell zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

Wassen

1. Was de parels als volgt:
   a. Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke monsterwell.
   b. Wacht 30 seconden.
   c. Verwijder alle supernatans uit elke well zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.
2. Was de parels een ***tweede*** keer.
3. Verwijder resterend EtOH uit elke well.
   Gebruik een P20-pipet met fijne tips.
4. Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

1. Verwijder de LP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
3. Voeg 27,5 µl RSB toe aan elke monsterwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
6. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'LS' ('Library Samples', bibliotheekmonsters).
9. Breng 25 µl van elk eluaat over van de LP2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de LS PCR-plaat.
10. Gooi de lege LP2 MIDI-plaat weg.

PCR indexeren

Bij deze stap worden de bibliotheekfragmenten geamplificeerd met primers die indexsequenties toevoegen voor multiplexing van monsters. Het resulterende product bevat de volledige bibliotheek van cDNA en/of DNA-fragmenten geflankeerd door adapters die vereist zijn voor de vorming van clusters.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - EPM: Bewaar op ijs.
   - UPxx: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. UPxx is de indexprimer die tijdens het instellen van de run is geselecteerd op het scherm 'Create Run' in de Local Run Manager-software.
   - CPxx: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. CPxx is de indexprimer die tijdens het instellen van de run is geselecteerd op het scherm 'Create Run' in de Local Run Manager-software.

2. Zorg dat de indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland op de Local Run Manager tijdens het instellen van de run. Zorg dat u de instructies voor indexselectie in *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32 volgt.

   LET OP

   Verkeerde combinaties tussen monsters en indexeringsprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportages vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie.

Procedure

1. Voeg 5 µl van de juiste indexprimer (UPxx of CPxx) toe aan de overeenkomstige monsterwell in de LS PCR-plaat volgens de geselecteerde indexen.

   LET OP

   Hanteer en open slechts één indexprimerbuisje per keer. Doe na gebruik onmiddellijk een nieuwe dop terug op elk indexbuisje. Combineer indexprimers niet met elkaar.

2. Vortex de EPM 5 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg 20 µl EPM toe aan elke monsterwell.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de LS PCR-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
5. Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
6. Breng de pre-amplificatiereagentia terug naar de opslag.

   LET OP

   Voer alle daaropvolgende stappen uit in een post-amplificatiezone om overdracht van amplificatieproduct te voorkomen.

7. Centrifugeer de LS PCR plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
8. Plaats op de voorgeprogrammeerde post-amplificatiethermocycler en voer het I-PCR-programma uit.
   Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.

OPMERKING Als u verder gaat met *Eerste hybridisatie voorbereiden* op pagina 59, volg dan de instructies voor het ontdooien van reagentia in 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

9. Centrifugeer na voltooiing van het I-PCR-programma de LS PCR plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
10. Label de plaat opnieuw, nu met 'ALS' ('Amplified Library Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters).

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de ALS PCR-plaat bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

Voorbereiden op protocolstappen

1. Zorg dat de thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie zijn ingesteld. Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
2. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 20 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TCB1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Tabel 21 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (invriezen) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TCA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Tabel 22 TruSight Oncology Comp Content Set Box (onderdeelnr. 20031122)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
OPR1 (rode dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden
OPD2 (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Eerste hybridisatie voorbereiden

Tijdens dit proces wordt een pool oligo's gehybridiseerd tot cDNA-bibliotheken en wordt een pool oligo's gehybridiseerd tot gDNA-bibliotheken bereid in *PCR indexeren* op pagina 57. Verrijking van gerichte regio's vereist twee hybridisatiestappen. Bij de eerste hybridisatie worden oligo's gedurende de nacht gehybridiseerd tot cDNA- en/of gDNA-bibliotheken (8–24 uur).

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - TCB1: Verwarm het buisje 5 minuten lang op 37 °C. Vortex 10 seconden lang om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - TCA1: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - OPR1: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

- OPD2: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

2. Als de ALS PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 × g. Vervolgens pipetteren om te mengen.
3. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'HYB1' (Hybridisatie 1).

Procedure

1. Breng 20 µl van elke cDNA- en/of gDNA-bibliotheek over van de ALS PCR-plaat naar de overeenkomende well van de HYB1 PCR-plaat.
2. Breng klevende plaatafdichting aan op de ALS PCR-plaat en leg deze opzij.
   Dicht de randen en wells volledig af.
3. Inspecteer de TCB1 op bezinksel. Warm het buisje, indien aanwezig, opnieuw op en vortex het buisje tot de kristallen zijn opgelost.
4. Voeg 15 µl TCB1 toe aan elke bibliotheekwell in de HYB1 PCR plaat.
5. Voeg 10 µl TCA1 toe aan elke bibliotheekwell in de HYB1 PCR plaat.
6. Voeg de probes toe.
   Verschillende soorten probes ***niet*** met elkaar combineren. Voeg slechts één probeset per well toe.
   - RNA-bibliotheekwells: 5 µl OPR1 (rode dop) bij elke bibliotheek afgeleid van RNA.
   - DNA TSO Comprehensive (EU)-bibliotheekwells: 5 µl OPD2 (witte dop) bij elke bibliotheek die is afgeleid van DNA voor verrijking met TSO Comprehensive (EU).
7. Breng klevende plaatafdichting aan op de HYB1 PCR plaat.

   ⚠ LET OP

   Zorg dat de randen en wells volledig zijn afgedicht om evaporatie te voorkomen.

8. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
9. Plaats op de thermocycler en voer het HYB1-programma uit.
   Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
10. Hybridiseer bij 57 °C gedurende minimaal 8 uur tot maximaal 24 uur.
11. Breng de hybridisatiereagentia terug naar de opslag.
12. Bewaar de ALS PCR-plaat bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

Voorbereiden op protocolstappen

1. Verwijder aan het begin van dag 2 het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 23 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SMB (donkerblauw label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee
ET2	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee Bibliotheken normaliseren
TCB1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Capture doelen – twee Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren

Tabel 24 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (invriezen) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
EE2	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee Bibliotheken normaliseren
EEW	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Capture doelen – één
TCA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden

Tabel 25 Assay Content Set Box (onderdeelnr. 20031122)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
OPR1 (rode dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden
OPD2 (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden

Capture doelen – één

Bij deze stap wordt gebruikgemaakt van SMB voor de capture van probes gehybridiseerd op de doelgebieden van belang. De parels worden driemaal gewassen met EEW. De verrijkte bibliotheken worden geëlueerd met vers EE2+HP3-elutiemengsel en geneutraliseerd met ET2.

Voorbereiden

1. Verwarm een micromonsterincubator met MIDI-verwarmingsblokinzet voor tot 57 °C.
2. Prepareer de volgende reagentia.
   - EEW: Vortex om te mengen gedurende 1 minuut.
   - EE2: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - HP3: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - SMB: Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
     - Zorg dat voor deze procedure **SMB** wordt gebruikt, niet SPB.
   - ET2: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
3. Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel in een microcentrifugebuisje.

   Tabel 26 EE2+HP3-elutiemengsel voor Capture doelen – één

Elutiemengsel-component	3 bibli-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

   Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg *Reagentia hanteren* op pagina 29 voor berekeningen.
4. Vortex het EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap *Elueren* op pagina 64.
5. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'CAP1' ('Capture 1').
6. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de HYB1 PCR plaat uit de thermocycler.
2. Centrifugeer de HYB1 PCR plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
3. Vortex de SMB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.

4. Voeg onmiddellijk 150 µl SMB toe aan elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat.
   Als een bak wordt gebruikt om SMB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,15 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SMB is toegevoegd aan elke well.
5. Stel de pipet in op 50 µl en breng het volledige volume van elke bibliotheek over van de HYB1 PCR plaat naar de overeenkomende well van de CAP1 MIDI-plaat.
6. Gooi de lege HYB1 PCR plaat weg.
7. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
8. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
9. Incubeer in de voorverwarmde micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 25 minuten.
10. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
11. Houd de CAP1 MIDI-plaat op de magnetische standaard en gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

LET OP

Ga direct door naar de volgende stap (*Wassen* op pagina 63). Laat het parelpellet niet al te lange tijd zitten zonder dat er vloeistof aanwezig is.

Wassen

1. Was de parels als volgt:
   a. Verwijder de CAP1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
   b. Voeg 200 µl EEW toe aan elke well.
   c. Stel het pipetvolume in op 150 µl en pipetteer minimaal 10 keer om te mengen. Zorg dat alle parels geresuspendeerd zijn.

   LET OP

   Zorg dat er geen parelpellets aanwezig zijn door de totale pareloplossing voorzichtig uit de well naar de tip te aspireren. Kijk dan in elke well of er nog een pellet aanwezig is. Breng de pipettip in een hoek aan op het parelpellet tijdens de stappen van het wassen om het pellet los te maken. Zorg dat het parelpellet volledig ondergedompeld is in de oplossing. De oplossing moet er donkerbruin uitzien met een homogene consistentie.

   d. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.
   e. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
   f. Schud bij 1800 tpm gedurende 4 minuten.
   g. Incubeer in een micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 5 minuten.
   h. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.

i. Houd deze op een magnetische standaard en verwijder alle supernatans uit elke well zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

2. Was de parels een ***tweede*** keer.
3. Was de parels een ***derde*** keer.
4. Verwijder resterend supernatans uit elke well.
   Gebruik een P20-pipet met fijne tips.

Elueren

1. Verwijder de CAP1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg voorzichtig 17 µl EE2+HP3-elutiemengsel toe aan elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat.
4. Gooi resterend EE2+HP3-elutiemengsel weg.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'ELU1' (Elutie 1).
9. Vortex de ET2 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
10. Voeg 5 µl ET2 toe aan elke overeenkomende bibliotheekwell in de nieuwe ELU1 PCR plaat.
11. Breng voorzichtig 15 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de ELU1 PCR-plaat.
12. Gooi de lege CAP1 MIDI-plaat weg.
13. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU1 PCR-plaat.
14. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
15. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
16. Breng de EEW terug naar de opslag.

Tweede hybridisatie voorbereiden

Bij deze stap worden doelregio's van de verrijkte cDNA- en/of gDNA-bibliotheken voor de tweede keer gebonden aan capture probes. De tweede hybridisatie garandeert een hoge specificiteit van de gecapturede regio's. Voer om een optimale verrijking van bibliotheken te garanderen de tweede hyrbridisatiestap uit bij 57 °C gedurende minimaal 1,5 uur tot maximaal 4 uur.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.

- TCB1: Verwarm het buisje 5 minuten lang op 37 °C. Vortex 10 seconden lang om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- TCA1: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- OPR1: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- OPD2: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Procedure

1. Inspecteer de TCB1 op bezinksel. Warm het buisje, indien aanwezig, opnieuw op en vortex het tot de kristallen zijn opgelost.
2. Voeg 15 µl TCB1 toe aan elke bibliotheekwell in de ELU1 PCR-plaat.
3. Voeg 10 µl TCA1 toe aan elke bibliotheekwell.
4. Voeg de probes toe.
   Verschillende soorten probes ***niet*** met elkaar combineren.
   - RNA-bibliotheekwells: 5 µl OPR1 (rode dop) bij elke bibliotheek afgeleid van RNA.
   - DNA TSO Comprehensive (EU)-bibliotheekwells: 5 µl OPD2 (witte dop) bij elke bibliotheek die is afgeleid van DNA voor verrijking met TSO Comprehensive (EU).
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU1 PCR-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
6. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
7. Plaats op een thermocycler en voer het HYB2-programma uit.
   Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.
8. Hybridiseer bij 57 °C gedurende minimaal 1,5 uur tot maximaal 4 uur.
9. Breng de hybridisatiereagentia terug naar de opslag.

Capture doelen – twee

Bij deze stap wordt gebruikgemaakt van SMB voor de capture van probes gehybridiseerd op de doelgebieden van belang. De parels worden eenmaal gewassen met RSB. De verrijkte bibliotheken worden geëlueerd met vers EE2+HP3-elutiemengsel en geneutraliseerd met ET2.

Voorbereiden

1. Verwarm een micromonsterincubator met MIDI-verwarmingsblokinzet voor tot 57 °C.
2. Prepareer de volgende reagentia.
   - EE2: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - HP3: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - SMB: Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.

- Zorg dat voor deze procedure **SMB** wordt gebruikt, niet SPB.
- RSB: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- ET2: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.

3. Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel in een microcentrifugebuisje.

Tabel 27 EE2+HP3-elutiemengsel voor Capture doelen – twee

Elutiemengsel-component	3 biblio-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Raadpleeg *Reagentia hanteren* op pagina 29 voor berekeningen.

4. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap *Elueren* op pagina 67.
5. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'CAP2' ('Capture 2').
6. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de ELU1 PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Centrifugeer de ELU1 PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
3. Vortex de SMB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
4. Voeg onmiddellijk 150 µl SMB toe aan elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat.
   Als een bak wordt gebruikt om SMB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,15 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SMB is toegevoegd aan elke well.
5. Stel de pipet in op 50 µl en breng het volledige volume van elke bibliotheek over van de ELU1 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de CAP2 MIDI-plaat.
6. Gooi de lege ELU1 PCR-plaat weg.
7. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
8. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
9. Incubeer in een micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 25 minuten.

OPMERKING Als u verder gaat met *Verrijkte bibliotheek amplificeren* op pagina 68, volg dan de instructies voor reagentia in de paragraaf 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

10. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.

11. Houd de CAP2 MIDI-plaat op een magnetische standaard en gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen uit elke bibliotheekwell zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

LET OP

Ga direct door naar de volgende stap (*Wassen* op pagina 67). Laat het parelpellet niet al te lange tijd zitten zonder dat er vloeistof aanwezig is.

Wassen

1. Verwijder de CAP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
3. Voeg 200 µl RSB toe aan elke well.
4. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud bij 1800 tpm gedurende 4 minuten.
6. Plaats gedurende 2 minuten op de magnetische standaard.
7. Houd de CAP2 MIDI-plaat op de magnetische standaard en verwijder alle supernatans zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.
8. Verwijder resterend supernatans uit elke well.
   Gebruik een P20-pipet met fijne tips.

Elueren

1. Verwijder de CAP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg 22 µl EE2+HP3-elutiemengsel toe aan elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat.
4. Gooi resterend EE2+HP3-elutiemengsel weg.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'ELU2' (Elutie 2).
9. Vortex de ET2 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
10. Voeg 5 µl ET2 toe aan elke overeenkomende bibliotheekwell in de nieuwe ELU2 PCR plaat.
11. Breng voorzichtig 20 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de ELU2 PCR-plaat.
12. Gooi de lege CAP2 MIDI-plaat weg.

13. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU2 PCR-plaat.
    Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
14. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
15. Breng de SMB, EE2, HP3 en ET2 terug naar de opslag.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de ELU2 PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 7 dagen. Breng de RSB terug naar de opslag.

Voorbereiden op protocolstappen

1. Bereid een ijsemmer voor.
2. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 28 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (invriezen) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
PPC3	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Verrijkte bibliotheek amplificeren
EPM	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Verrijkte bibliotheek amplificeren

Tabel 29 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren Voorbereiden op sequencing

Verrijkte bibliotheek amplificeren

Bij deze stap worden primers gebruikt om verrijkte bibliotheken te amplificeren.

Voorbereiden

1. Als de ELU2-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 × g.

Procedure

1. Vortex PPC3 om te mengen en centrifugeer daarna kort.
2. Voeg 5 µl PPC3 toe aan elke bibliotheekwell van de ELU2 PCR-plaat.
3. Vortex EPM 5 seconden lang om te mengen en centrifugeer daarna kort.
4. Voeg 20 µl EPM toe aan elke bibliotheekwell.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU2 PCR-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
6. Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
7. Plaats op een thermocycler en voer het EL-PCR-programma uit.
   Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 38.

   Opmerking Als u verder gaat met *Bibliotheken normaliseren* op pagina 72, volg dan de instructies voor ontdooien in de paragraaf 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

8. Zet de PPC3 en EPM terug in de opslag.

Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren

Bij deze stap wordt SPB gebruikt om de verrijkte bibliotheken te zuiveren van ongewenste reactiecomponenten. De parels worden tweemaal gewassen met verse 80% ethanol. De bibliotheken worden geëlueerd met RSB.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - SPB: Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
     - Zorg dat voor deze procedure **SPB** wordt gebruikt, niet SMB.
   - RSB: Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Bereid verse 80% ethanol in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

   Afbeelding 4 Bereid verse 80% ethanol

Reagens (ml)	3 biblio-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
100% ethanolalcohol, puur	2	4	8	12	24
RNase/DNase-vrij water	0,5	1	2	3	6

3. Vortex verse 80% EtOH om te mengen.

4. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'BIND2' (Zuivering binding).
5. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Verwijder de ELU2 PCR-plaat uit de thermocycler.
2. Centrifugeer de ELU2 PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g.
3. Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
4. Voeg onmiddellijk 110 µl SPB toe aan elke bibliotheekwell van de BIND2 MIDI-plaat.
5. Breng 50 µl van elke bibliotheek over van de ELU2 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BIND2 MIDI-plaat.
6. Gooi de lege ELU2 PCR plaat weg.
7. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
8. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
9. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
10. Plaats de plaat gedurende 5 minuten op een magnetische standaard.
11. Gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om ***alle*** supernatans te verwijderen uit elke bibliotheekwell zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

Wassen

1. Was de parels als volgt:
   a. Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% ethanol toe aan elke well.
   b. Wacht 30 seconden.
   c. Verwijder alle supernatans uit elke monsterwell zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.
2. Was de parels een ***tweede*** keer.
3. Verwijder resterend EtOH uit elke well.
   Gebruik een P20-pipet met fijne tips.
4. Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

1. Verwijder de BIND2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Inverteer of vortex om RSB te mengen.
3. Voeg 32 µl RSB toe aan elke bibliotheekwell.

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

4. Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND2 MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
5. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
6. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'PL' ('Purified Libraries', gezuiverde bibliotheken).
9. Breng 30 µl van elk eluaat over van de BIND2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de PL PCR-plaat.
10. Gooi de lege BIND2 MIDI-plaat weg.
11. Breng klevende plaatafdichting aan op de PL PCR plaat.
12. Breng de SPB terug naar de opslag.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de PL PCR plaat 1 minuut lang op 280 × g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen. Breng de RSB terug naar de opslag.

Voorbereiden op protocolstappen

1. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 30 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (invriezen) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
LNA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
EE2	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren

Tabel 31 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
LNB1	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren Voorbereiden op sequencing
LNW1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
LNS1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren

2. Als u op dezelfde dag verder gaat met *Voorbereiden op sequencing* op pagina 75, volg dan de instructies voor ontdooien in de paragraaf 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

Bibliotheken normaliseren

Bij dit proces wordt LNB1 plus additieven (LNA1) gebruikt om de hoeveelheid van elke bibliotheek te normaliseren om zeker te zijn van een uniforme bibliotheekrepresentatie in de gepoolde bibliotheken. De parels worden tweemaal gewassen met LNW1. De bibliotheken worden geëlueerd met vers EE2+HP3-elutiemengsel en geneutraliseerd met LNS1.

Voorbereiden

1. Prepareer de volgende reagentia.
   - LNB1: Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
   - LNA1: Vortex om te mengen.
   - EE2: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - HP3: Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
   - LNW1: Vortex om te mengen. Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
   - LNS1: Vortex om te mengen. Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
2. Vortex de LNB1 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
   Inverteer het LNB1-buisje om er zeker van te zijn dat alle parels geresuspendeerd zijn.
3. Pipetteer met een P1000 ingesteld op 800 µl LNB1 10 keer omhoog en omlaag om resuspensie te garanderen.
4. Prepareer onmiddellijk vers LNA1+LNB1-mastermengsel in een conisch buisje.

   LET OP

   Resuspendeer het LNB1-parelpellet op de bodem van het buisje volledig om een inconsistente clusterdichtheid te voorkomen.

   Tabel 32 LNA1+LNB1-mastermengsel

Mastermengsel-component	3 biblio-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

   Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie *Reagentia hanteren* op pagina 29 voor berekeningen.
5. Vortex het LNA1+LNB1-mastermengsel. Leg opzij voor de stap *Binden* op pagina 73.
6. Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel in een microcentrifugebuisje.

Tabel 33 EE2+HP3-elutiemengsel voor het normaliseren van bibliotheken

Elutiemengsel-component	3 biblio-theken	8 biblio-theken	16 biblio-theken	24 biblio-theken	48 biblio-theken
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie *Reagentia hanteren* op pagina 29 voor berekeningen.

7. Vortex het verse elutiemengsel en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap *Elueren* op pagina 74.
8. Als de PL PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid, daarna 1 minuut lang centrifugeren op 280 × g en vervolgens pipetteren om te mengen.
9. Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'BBN' ('Bead Based Normalization', normalisatie op basis van parels).
10. Pak de magneet.

Procedure

Binden

1. Vortex het LNA1+LNB1-mastermengsel.
2. Voeg onmiddellijk 45 µl LNA1+LNB1-mastermengsel toe aan elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat.
3. Gooi resterend LNA1+LNB1-mastermengsel weg.
4. Breng 20 µl van elke bibliotheek over van de PL PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BBN MIDI-plaat.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud bij 1800 tpm gedurende 30 minuten.
7. Breng klevende plaatafdichting aan op de PL PCR-plaat en breng deze terug naar de opslag.
8. Plaats de plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
9. Houd deze op een magnetische standaard en gebruik een P200-pipet om alle supernatans te verwijderen uit elke well zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

Wassen

1. Was de parels als volgt:
   a. Verwijder de BBN MIDI-plaat van de magnetische standaard.
   b. Voeg 45 µl LNW1 toe aan elke bibliotheekwell.
   c. Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
   d. Dicht de randen en wells volledig af.
   e. Schud bij 1800 tpm gedurende 5 minuten.

f. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
g. Verwijder alle supernatans uit elke well zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

2. Was de parels een ***tweede*** keer.
3. Verwijder resterend supernatans uit elke well.
   Gebruik een P20-pipet met fijne tips.

Elueren

1. Verwijder de BBN MIDI-plaat van de magnetische standaard.
2. Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
3. Voeg 32 µl EE2+HP3-oplossing toe aan elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat.
4. Gooi resterend elutiemengsel weg.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
6. Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
7. Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
8. Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'NL' ('Normalized Libraries', genormaliseerde bibliotheken).
9. Breng voorzichtig 30 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de NL PCR-plaat.

⚠ LET OP

Als de parels in de pipettips worden geaspireerd, moet u de parels terugdoen op de plaat op de magnetische standaard en wachten tot de vloeistof helder is (ca. 2 minuten) voordat u verdergaat naar de volgende stap van de procedure.

10. Gooi de lege BBN MIDI-plaat weg.
11. Vortex de LNS1 om te mengen.
12. Voeg 30 µl LNS1 toe aan elke bibliotheekwell in de nieuwe NL PCR plaat.
13. Pipetteer vijf keer om te mengen.
14. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.
    Dicht de randen en wells volledig af.
15. Breng de LNB1, LNA1, EE2, LNW1 en LNS1 terug naar de opslag.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de NL PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

Voorbereiden op protocolstappen

Start de preparatie van de verbruiksmaterialen voor sequencing uit de NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2.5 (300 cycli) (onderdeelnr. 20028871) ten minste een uur voor gebruik.

1. Verwijder de bibliotheekverdunningsbuffer (HT1) uit de opslag van -25 °C tot -15 °C, laat ontdooien tot kamertemperatuur en plaats vervolgens op ijs.
2. Volg de preparatie-instructies in de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor andere verbruiksmaterialen in de kit.
   - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycli)
   - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycli)
   - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycli)
3. Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 34 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (invriezen) (onderdeelnr. 20031121

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
PhiX Internal Control (PhiX)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur. Bewaar op ijs.	Voorbereiden op sequencing

Tabel 35 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (koel bewaren) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Voorbereiden op sequencing
RSB (roze label)	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Voorbereiden op sequencing

Voorbereiden op sequencing

Voorbereiden

1. Lees de richtlijnen voor *Aantal bibliotheken en indexen selecteren* op pagina 32.
2. Label een microcentrifugebuisje met 'dHP3' ('diluted HP3', verdunde HP3).
3. Label een microcentrifugebuisje met 'dPhiX' ('diluted PhiX', verdunde PhiX).
4. Verwarm een verwarmingsblok voor tot 96 °C voor microcentrifugebuisjes.
5. Bereid een ijsemmer voor.

PhiX-controle verdunnen en denatureren

1. Vortex de HP3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
2. Combineer de volgende volumes in het dHP3-microcentrifugebuisje.

- 10 µl HP3
- 190 µl RNase/DNasevrij-water

3. Vortex de dHP3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
4. Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
5. Vortex de PhiX-controle om te mengen en daarna kort centrifugeren.
6. Combineer de volgende volumes in het dPhiX-microcentrifugebuisje.
   - 8 µl RSB
   - 2 µl PhiX-controle
7. Voeg 10 µl dHP3 toe aan het dPhiX-buisje.
8. Gooi het dHP3-buisje weg.
9. Vortex het dPhiX-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
10. Incubeer de dPhiX 5 minuten lang bij kamertemperatuur om te denatureren.
11. Vortex de HT1 om te mengen.
12. Voeg onmiddellijk 980 µl voorgekoelde HT1 toe aan de dPhiX.
13. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
14. Plaats de dPhiX op ijs tot gebruik bij het voorbereiden van de tweede verdunning.
    De uiteindelijke concentratie is 20 pM dPhiX.
15. Breng de PhiX, HP3 en RSB terug naar de opslag.

Bibliotheken poolen en denatureren voor TSO Comprehensive (EU)

1. Als de NL PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 × g.
2. Pipetteer/meng de bibliotheken in de NL PCR-plaat vijf keer met een meerkanaals pipet ingesteld op 30 µl. Gebruik verse tips voor elke bibliotheek.

   LET OP

   Zorg dat de bibliotheken goed gemengd zijn, voor een optimale prestatie.

3. Selecteer een van de volgende opties om de bibliotheken te poolen, denatureren en verdunnen.
   - **Optie 1:** Sequence de bibliotheken afgeleid van RNA-monsters en DNA-monsters tegelijkertijd. Raadpleeg *Optie 1: DNA- en RNA-bibliotheken samen* op pagina 77.
   - **Optie 2:** Sequence de bibliotheken afgeleid van alleen DNA-monsters. Raadpleeg *Optie 2: Alleen DNA-bibliotheken* op pagina 78.
   - **Optie 3:** Sequence de bibliotheken afgeleid van alleen RNA-monsters. Raadpleeg *Optie 3: alleen RNA bibliotheken* op pagina 79.

Optie 1: DNA- en RNA-bibliotheken samen

1. Label een microcentrifugebuisje met PRL (Pooled RNA Libraries, gepoolde RNA-bibliotheken).
2. Label een microcentrifugebuisje met PDL (Pooled DNA Libraries, gepoolde DNA-bibliotheken).
3. Breng 10 µl van elke genormaliseerde RNA (cDNA)-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PRL-buisje. Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
4. Breng 10 µl van elke genormaliseerde DNA-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PDL-buisje. Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
5. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat. Dicht de randen en wells volledig af.
6. Vortex elk PRL- en PDL-buisje om te mengen.
7. Centrifugeer de PRL- en PDL-buisjes kort.
8. Incubeer de PRL- en PDL-buisjes in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
9. Plaats de PRL en PDL op ijs gedurende 5 minuten.
10. Vortex de PRL- en PDL-buisjes om te mengen en daarna kort centrifugeren.
11. Zet de PRL- en PDL-buisjes terug op ijs.

Eerste verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 1,7 ml met 'DIL1' ('Dilution 1', verdunning 1).
2. Breng 20 µl PDL over naar het lege DIL1-buisje.
3. Voeg 5 µl PRL toe aan DIL1.
4. Gooi de PDL- en PRL buisjes weg.
5. Voeg 475 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
6. Vortex het DIL1-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Tweede verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met DIL2 (Dilution 2, verdunning 2).
2. Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
3. Gooi het DIL1-buisje weg.
4. Voeg 1660 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:850).
5. Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX om te mengen en daarna kort centrifugeren.
6. Voeg 2,5 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
7. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
8. Doe 1300 µl DIL2 op de NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycli). Raadpleeg *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor meer informatie.

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

9. Gooi het DIL2-buisje weg.
10. Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
11. Ga verder naar de sequencing.
    Raadpleeg *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor meer informatie.

Optie 2: Alleen DNA-bibliotheken

1. Label een microcentrifugebuisje met PDL (Pooled DNA Libraries, gepoolde DNA-bibliotheken).
2. Breng 10 µl van elke genormaliseerde DNA-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PDL-buisje.
   Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
4. Vortex het PDL-buisje om te mengen.
5. Centrifugeer het PDL-buisje kort.
6. Incubeer het PDL-buisje in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
7. Plaats de PDL op ijs gedurende 5 minuten.
8. Vortex het PDL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Zet het PDL-buisje terug op ijs.

Eerste verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 1,7 ml met 'DIL1' ('Dilution 1', verdunning 1).
2. Breng 10 µl PDL over naar het lege DIL1-buisje.
3. Gooi het PDL buisje weg.
4. Voeg 190 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
5. Vortex DIL1 om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Tweede verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met DIL2 (Dilution 2, verdunning 2).
2. Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
3. Gooi het DIL1-buisje weg.
4. Voeg 1660 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:850).
5. Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX en daarna kort centrifugeren.
6. Voeg 2,5 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
7. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.

8. Doe 1300 µl DIL2 op de NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycli).
   Raadpleeg *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor meer informatie.
9. Gooi het DIL2-buisje weg.
10. Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar vervolgens maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
11. Ga verder naar de sequencing.
    Raadpleeg Referentiegids van het *NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor meer informatie.

Optie 3: alleen RNA bibliotheken

1. Label een microcentrifugebuisje met PRL (Pooled RNA Libraries, gepoolde RNA-bibliotheken).
2. Breng 10 µl van elke genormaliseerde RNA (cDNA)-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PRL-buisje.
   Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
3. Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.
   Dicht de randen en wells volledig af.
4. Vortex het PRL-buisje om te mengen.
5. Centrifugeer het PRL-buisje kort.
6. Incubeer het PRL-buisje in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
7. Plaats de PRL op ijs gedurende 5 minuten.
8. Vortex het PRL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
9. Zet het PRL-buisje terug op ijs.

Eerste verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 1,7 ml met 'DIL1' ('Dilution 1', verdunning 1).
2. Breng 10 µl PRL over naar het lege DIL1-buisje.
3. Gooi het PRL -buisje weg.
4. Voeg 190 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
5. Vortex DIL1 om te mengen en daarna kort centrifugeren.

Tweede verdunning voorbereiden

1. Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met DIL2 (Dilution 2, verdunning 2).
2. Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
3. Gooi het DIL1-buisje weg.
4. Voeg 1646 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:843).
5. Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX en daarna kort centrifugeren.

6. Voeg 16,7 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
7. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
8. Doe 1300 µl DIL2 in de NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycli).
   Raadpleeg *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor meer informatie.
9. Gooi het DIL2-buisje weg.
10. Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
11. Ga verder naar de sequencing.
    Raadpleeg *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)* voor meer informatie.

Interpretatie van de resultaten

De sequencingresultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay worden voor elk afzonderlijk monster gerapporteerd in een pdf -rapport en een json-rapport. Er wordt ook op monsterniveau een Low Depth Report (`LowDepthReport.tsv`) gegenereerd. Op runniveau worden de volgende outputbestanden gegenereerd:

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

Alleen varianten die de kwaliteitscontrole doorstaan, verschijnen in de definitieve pdf- en json-rapporten.

Raadpleeg voor detailinformatie over de analyse de *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (documentnr. 200008661)*.

Resultaten begeleidende diagnostiek

Voor elk beoogd gebruik van de begeleidende diagnostiek (CDx) zijn er drie mogelijke resultaten:

- **Positief:** Een variant wordt gedetecteerd en geclassificeerd als niveau 1 (CDx).
- **Niet gedetecteerd:** Er worden geen varianten of biomarkers geassocieerd met het beoogde CDx-gebruik gedetecteerd in het monster. Het tumortype geselecteerd voor het monster is geschikt voor de CDx.
- **Geen resultaat:** Een bepaling van een variantstatus is niet mogelijk om een of meer van de volgende redenen:
  - Het beoogde CDx-gebruik was niet van toepassing op het geteste monster omdat het tumortype dat werd geselecteerd voor het monster niet geschikt is voor een tumortype van de CDx.
  - De sequencing-run heeft niet voldaan aan de specificaties voor kwaliteitscontrole.
  - De bibliotheek heeft niet voldaan aan de vereiste specificaties voor kwaliteitscontrole.
  - Het geschikte nucleïnezuur is niet uitgevoerd.

Alle resultaten voor het beoogde CDx-gebruik worden gerapporteerd in het deel 'Companion Diagnostic Results' (Resultaten begeleidende diagnostiek) van het json-rapport. Alleen de beoogde gebruiken met een positief resultaat worden vermeld in het deel 'Companion Diagnostic Results' (Resultaten begeleidende diagnostiek) van het pdf-rapport.

Tumorprofilering van varianten

TSO Comprehensive (EU) is ontworpen voor het rapporteren van somatische varianten bij rapportage van varianten met bewijs van klinische relevantie of varianten met mogelijke klinische relevantie. De TSO Comprehensive (EU)-assay-software gebruikt een kennisbank die bepaalt of elke gedetecteerde en in aanmerking komende variant (Tabel 2) klinisch relevant of mogelijk klinisch relevant is op basis van bewijs voor therapeutische, diagnostische of prognostische associaties. De kennisbank houdt er ook rekening mee of er associaties zijn vastgesteld (of niet) in het geteste tumortype. Gevoeligheids- of kankerrisicoassociaties zijn niet opgenomen in de kennisbank. Veelvoorkomende polymorfismen zijn verwijderd.

Voor varianten van tumorprofilering worden positieve resultaten geclassificeerd in genomische bevindingen met bewijs van klinische relevantie of genomische bevindingen met mogelijk klinische relevantie volgens de geïnstalleerde kennisbank en het geïdentificeerde type tumor.

Fouten bij de kwaliteitscontrole leiden tot geen resultaten voor de varianttypen die relevant zijn voor de mislukte kwaliteitscontrolemeetwaarde. Raadpleeg *TSO Comprehensive (EU)-rapportresultaat van metrische QC-gegevens* op pagina 82 en *TSO Comprehensive (EU)-rapportresultaat van controlemeetwaarden* op pagina 86 voor meer informatie. Tumorprofielposities met onvoldoende diepte worden vermeld in het Low Depth Report (Lagediepterapport) en niet in het TSO Comprehensive (EU)-rapport.

Kwaliteitscontrole

- Raadpleeg *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23 voor kwantificatie-informatie over nucleïnezuren en minimale vereisten voor inputmaterialen.
- De geldigheid van een sequencing-run en een monster worden automatisch bepaald en gerapporteerd door de TSO Comprehensive (EU)-analysemodule. De software produceert een `MetricsOutput.tsv`-bestand (inclusief resultaten van de run, DNA-bibliotheek en kwaliteitscontroleresultaten van RNA-bibliotheek) en een `ControlOutput.tsv`-bestand (inclusief controleresultaten) waarin wordt gerapporteerd over de volgende meetwaarden en specificaties:

Tabel 36 TSO Comprehensive (EU)-rapportresultaat van metrische QC-gegevens

Outputtype	Meetwaarde	Specificatie	Omschrijving	Impact van specificatiefalen*
Sequencing-run	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Percentage aflezingen dat door het filter komt (PF).	Sequencing-run ongeldig, geen resultaten gerapporteerd voor monsters in de run.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Gemiddeld percentage basebepalingen met kwaliteitsscore Q30 of hoger voor Aflezing 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80%	Gemiddeld percentage basebepalingen met kwaliteitsscore Q30 of hoger voor Aflezing 2.	

Outputtype	Meetwaarde	Specificatie	Omschrijving	Impact van specificatiefalen*
DNA-bibliotheken	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 OF > 3106 en P_VALUE ≤ 0,049	Een meetwaarde die de kans op besmetting beoordeelt met behulp van de VAF van veelvoorkomende varianten. De verontreinigingsscore op basis van VAF-verdeling van SNP's. De verontreinigings-P-waarde gebruikt bij de beoordeling van sterk herschikte genomen, alleen van toepassing wanneer de verontreinigingsscore boven de bovenste specificatiegrens ligt.	Geen DNA-resultaten gemeld.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	De mediane fragmentlengte in het monster.	Geen TMB- of kleine DNA-variantresultaten gemeld.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (telling)	≥ 150	Mediane exonfragment coverage van alle exonbasen.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Percentage exonbasen met fragment coverage van 50X.	

Outputtype	Meetwaarde	Specificatie	Omschrijving	Impact van specificatiefalen*
	USABLE_MSI_SITES (aantal)	≥ 40	Het aantal MSI-locaties dat kan worden gebruikt voor MSI-bepaling (aantal microsatellietlocaties met voldoende bestrijkende aflezingen om microsatellietinstabiliteit te detecteren).	Geen MSI-resultaten gemeld.
	COVERAGE_MAD (telling)	≤ 0,210	De mediaan van de absolute deviaties van de mediaan van de genormaliseerde telling van elke CNV-targetregio.	Geen genamplificatieresultaten gemeld.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (telling)	≥ 1,0	De mediane ruwe bin-telling per CNV-target.	

Outputtype	Meetwaarde	Specificatie	Omschrijving	Impact van specificatiefalen*
RNA-bibliotheken	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80,0	De mediane fragmentlengte in het monster.	Geen fusies of splicevariantresultaten gemeld.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (coëfficiënt)	≥ 93,0	MEDIAN_CV_GENE_500X is een maat voor de uniformiteit van de coverage. Voor elk gen met ten minste 500x coverage wordt de variatiecoëfficiënt van de coverage van het genlichaam berekend. Deze meetwaarde is de mediaan van deze waarden. Een hoge waarde duidt op een grote variatie en op een probleem bij de library prep, zoals een lage hoeveelheid ingevoerd monster en/of problemen met de pull-down assay met een probe. Deze meetwaarde wordt berekend uit alle aflezingen (inclusief aflezingen gemarkeerd als duplicaten).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (telling)	≥ 9.000.000	Het totale aantal aflezingen dat mapt met de targetregio's. Deze meetwaarde wordt berekend uit alle aflezingen (inclusief aflezingen gemarkeerd als duplicaten).	

*Succesvolle resultaten geven 'PASS' weer.

Tabel 37 TSO Comprehensive (EU)-rapportresultaat van controlemeetwaarden

Outputtype	Meetwaarde	Specificatie	Impact van specificatiefalen*
Positieve controle	DNA External Control (DNA-externe controle) (TSO Comprehensive (EU))	23 van 24 gespecificeerde varianten gedetecteerd	Patiëntmonsters moeten op basis van resultaten van controlemonsters handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
	RNA External Control	12 van 13 gespecificeerde varianten gedetecteerd	
Amplificatiereagenscontrole	Mediane exondekking voor DNA voor TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Patiëntmonsters moeten op basis van resultaten van controlemonsters handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
	Grenswaarde RNA-gen boven mediaan	≤ 1	

*Succesvolle resultaten geven 'PASS' weer.

- Het TSO Comprehensive (EU)-rapport, dat beschikbaar is in pdf- en json-opmaak, vat de resultaten van de kwaliteitscontrole samen. De rapporten zitten in de analysemap. Raadpleeg de Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)-analysemodule (documentnr. 200008661) voor de locatie van de analysemap (bevat pdf en json-rapporten) en de runmap.
- Herhaal de sequencing-runs die ongeldig zijn.
- Herhaal tests van bibliotheken met de volgende resultaten:
  - Gecontamineerde DNA-bibliotheken
  - Ongeldige RNA-bibliotheken
  - Tests kunnen worden herhaald om meer variant- of biomarkerresultaten te verkrijgen voor DNA-bibliotheken die ongeldig werden verklaard voor één maar niet alle varianttypen.

- Positieve controles worden beoordeeld voor variantbepaling. Indien positieve controles niet voldoen aan de specificaties voor variantbepaling, moet de sequencing-run handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
- NTC's worden beoordeeld ten opzichte van de mediane exondekking voor DNA en genen boven de mediane grenswaarde voor RNA. Indien negatieve controles niet aan de specificaties voldoen, moeten de bibliotheekpreparatiecyclus en alle bijbehorende sequencing-runs handmatig ongeldig worden verklaard. De analysemodulesoftware maakt patiëntmonsters niet automatisch ongeldig op basis van resultaten van controlemonsters.
- Voer in overeenstemming met lokale, provinciale en/of nationale voorschriften of accreditatievereisten aanvullende kwaliteitscontrolemaatregelen uit.

Raadpleeg voor meer informatie over het herhalen van sequencing-runs of het testen van bibliotheken *Problemen oplossen* op pagina 88.

Problemen oplossen

Gebruik de volgende tabel om problemen in de workflow op te lossen. Als een sequencing-run of bibliotheekpreparatie van een monster tweemaal faalt, kan extra foutopsporing nodig zijn. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina.

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen actie
De sequencing-run voldoet niet aan de kwaliteitscontrole-specificaties voor een run	Gebruiksfout of labapparatuurfout in de assay-workflow	Herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina indien dit niet bekend is, of als er andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen. • Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (Normalized Libraries, genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg *Voorbereiden op sequencing* op pagina 75. • Verrijk bibliotheken uit de ALS (Amplified Libraries Samples, geamplificeerde bibliotheekmonsters) PCR-plaat opnieuw. Raadpleeg *Eerste hybridisatie voorbereiden* op pagina 59. • Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg *Denaturatie en hybridisatie RNA* op pagina 46 of *gDNA fragmenteren* op pagina 50.
	Instrumentprobleem	Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina.
Fout bij rapportgeneratie of algemene sequencerfout (bijv. netwerkfout, fout bij laden/uitladen reagentia, etc.)	Software- of instrumentprobleem	Raadpleeg de *Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (documentnr. 200008661)* voor hulp bij het genereren van rapporten of raadpleeg de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 1000000009513)*. Neem voor aanvullende hulp contact op met de technische ondersteuning van Illumina.

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen actie
De DNA-bibliotheek voldoet niet aan de kwaliteitscontrole-specificaties	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer	Zorg voor de juiste monsterinvoer en herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf de stap 'gDNA fragmenteren'. Raadpleeg *Weefselvereisten* op pagina 23 en *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23.
	Gebruiks- of apparatuurfout in de assay-workflow	Herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina indien dit niet bekend is, of als er andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen. • Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (Normalized Libraries, genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg *Voorbereiden op sequencing* op pagina 75. • Verrijk bibliotheken uit de ALS (Amplified Libraries Samples, geamplificeerde bibliotheekmonsters) PCR-plaat opnieuw. Raadpleeg *Eerste hybridisatie voorbereiden* op pagina 59. • Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg *gDNA fragmenteren* op pagina 50.

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen actie
	Niet voldaan aan de criteria voor CONTAMINATION_SCORE en CONTAMINATION_P_VALUE	Bekijk 'Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen' voor informatie over het vermijden van kruisverontreiniging. Bekijk de plaatlay-out en bibliotheekindexering om er zeker van te zijn dat bibliotheken van dezelfde index niet samen gesequencet zijn. Start de bibliotheekpreparatie voor de betreffende bibliotheken vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg *gDNA fragmenteren* op pagina 50. Er is mogelijk contaminatie opgetreden tijdens de monsterextractie. Het kan nodig zijn om de extractie te herhalen om er zeker van te zijn dat het monster vrij is van contaminatie.
	Bruikbare MSI mislukt	Lees de instellingen voor gebruik en bediening van de fabrikant van de ultrasonicator (waaronder waterniveau en buistype). Zorg dat het juiste monster wordt ingevoerd in de assay. Raadpleeg *Weefselvereisten* op pagina 23 en *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23. Extractie van een nieuw monster en/of herhaling van de stap voor het fragmenteren van gDNA kan nodig zijn als het monster te veel gefragmenteerd of beschadigd is.
De DNA-bibliotheek voldoet niet aan de kwaliteitscontrole-specificaties	Het monster is mogelijk overmatig gefragmenteerd of heeft nucleïnezuurschade die invloed heeft op het vermogen voldoende unieke bibliotheken te genereren	Lees de instellingen voor gebruik en bediening van de fabrikant van de ultrasonicator (waaronder waterniveau en buistype). Zorg dat het juiste monster wordt ingevoerd in de assay. Raadpleeg *Weefselvereisten* op pagina 23 en *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23. Extractie van een nieuw monster en/of herhaling van de stap voor het fragmenteren van gDNA kan nodig zijn als het monster te veel gefragmenteerd of beschadigd is.

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen actie
De RNA-bibliotheek voldoet niet aan de kwaliteitscontrole-specificaties	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer	Zorg voor de juiste monsterinvoer en herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf de stap 'Denaturatie en hybridisatie RNA'. Raadpleeg *Weefselvereisten* op pagina 23 en *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23.
	Gebruiks- of apparatuurfout in de assay-workflow	Herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina indien dit niet bekend is, of als er andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen. • Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (Normalized Libraries, genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg *Voorbereiden op sequencing* op pagina 75. • Verrijk bibliotheken uit de ALS (Amplified Libraries Samples, geamplificeerde bibliotheekmonsters) PCR-plaat opnieuw. Raadpleeg *Eerste hybridisatie voorbereiden* op pagina 59. • Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg *Denaturatie en hybridisatie RNA* op pagina 46.
	Het monster is mogelijk overmatig gefragmenteerd of heeft nucleïnezuurschade die invloed heeft op het vermogen voldoende unieke bibliotheken te genereren	Zorg dat het juiste monster wordt ingevoerd. Raadpleeg *Weefselvereisten* op pagina 23 en *Extractie, kwantificatie en opslag van nucleïnezuren* op pagina 23. Extractie van een nieuw monster kan nodig zijn als het monster te veel gefragmenteerd of beschadigd is.

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen actie
Positieve controle gefaald (DNA/RNA)	Er is niet voldaan aan de vereisten voor monsterinvoer voor de positieve controle	Zorg voor de juiste invoer in de assay. Controleer de plaatlay-out en zorg dat de juiste reagentia (probes, indexen) in de juiste wells zitten. Zorg dat het positieve controlemonster volgens het label wordt opgeslagen. Herhaal voor alle monsters die de positieve controle delen de bibliotheekpreparatie vanaf een van de volgende stappen, afhankelijk van waar de vermoede gebruiks- of apparatuurfout is opgetreden. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina indien dit niet bekend is, of als er andere fouten zijn opgetreden, om de problemen met uw run op te lossen. • Herhaal het sequencen van de bibliotheken uit de NL (Normalized Libraries, genormaliseerde bibliotheken) PCR-plaat. Raadpleeg *Voorbereiden op sequencing* op pagina 75. • Verrijk bibliotheken uit de ALS (Amplified Libraries Samples, geamplificeerde bibliotheekmonsters) PCR-plaat opnieuw. Raadpleeg *Eerste hybridisatie voorbereiden* op pagina 59. • Start de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow. Raadpleeg *Denaturatie en hybridisatie RNA* op pagina 46 of *gDNA fragmenteren* op pagina 50.
	Gebruiksfout of apparatuurfout in de assay-workflow	
NTC mislukt (DNA/RNA)	Er is kruisverontreiniging opgetreden of het werkgebied is gecontamineerd	Bekijk de paragraaf 'Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen' voor informatie over het ontsmetten van werkgebieden. Bekijk 'Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen' voor informatie over het vermijden van kruisverontreiniging. Bekijk de plaatlay-out en bibliotheekindexering om er zeker van te zijn dat bibliotheken van dezelfde index niet samen gesequencet zijn. Herhaal de bibliotheekpreparatie vanaf het begin van de workflow voor alle bibliotheken die de amplificatiereagenscontrole delen.
	Onjuiste indexering van de bibliotheek	

Observatie	Mogelijke oorzaak	Aanbevolen actie
De software geeft aan dat er geen positieve en/of negatieve controles zijn opgenomen in de sequencing-run	Onjuiste toewijzing van tumortype in de runplanning van Local Run Manager	Plaats de analyse opnieuw in de wachtrij met controles die juist werden geïdentificeerd zoals aangegeven in de Workflowhandleiding voor Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (documentnr. 200008661).

Werkingseigenschappen

TSO Comprehensive (EU) is een gericht NGS-panel met 517 genen. Kleine DNA-varianten (single-nucleotide varianten (SNV's), multi-nucleotide-varianten (MNV's), inserties en deleties) komen in aanmerking voor rapportage van alle 517 genen. Genamplificaties komen in aanmerking voor rapportage van de MET- en ERBB2-genen. Fusies komen in aanmerking voor rapportage van de 23 genen die in *Genenpanel van de TSO Comprehensive (EU)-assay* op pagina 2 worden vermeld. Splicingvarianten van de MET- en EGFR-genen komen in aanmerking voor rapportage. Voor rapportage moeten varianten worden gedetecteerd en naar voren komen in de kennisbank van de TSO Comprehensive (EU)-assay en in aanmerking komen op basis van het geteste weefseltype. Om te worden gerapporteerd, wordt voor NTRK-fusies vereist dat de fusiepartner 5' is en dat het NTRK-kinasedomein intact is.

Bij kleine DNA-varianten werd een representatieve benadering voor validatie van de doelgenen in het panel uitgevoerd met gegevens die SNV's, MNV's, inserties en deleties vertegenwoordigen. Bij genamplificaties, fusies en splicevarianten werden tests uitgevoerd op het genniveau. TMB en MSI werden geëvalueerd waar aangegeven. Voor de NTRK CDx-claim werden fusies in FFPE-monsters getest in onderzoeken die gericht waren op de prestaties die specifiek zijn voor de claim (d.w.z. detectielimiet, intralaboratoriumprecisie, reproduceerbaarheid, nauwkeurigheid en klinische prestaties).

Tabel 38 geeft definities van meetwaarden berekend in verschillende onderzoeken.

Tabel 38 Definities van meetwaarden

Term	Definitie
Positieve procentuele overeenkomst (Positive Percent Agreement, PPA)	Het percentage positieven die juist zijn geïdentificeerd uit de totale positieven ten opzichte van een orthogonale methode.
Negatieve procentuele overeenkomst (Negative Percent Agreement, NPA)	Het percentage negatieven die juist zijn geïdentificeerd uit de totale negatieven ten opzichte van een orthogonale methode.

Term	Definitie
Positief concordantiepercentage (Positive Percent Concordance, PPC)	Het percentage positieve bepalingen die juist zijn geïdentificeerd uit de totale positieven ten opzichte van een controlevoorwaarde in een directe paarsgewijze vergelijking.
Negatief concordantiepercentage (Negative Percent Concordance, NPC)	Het percentage negatieve bepalingen die juist zijn geïdentificeerd uit de totale negatieven ten opzichte van een controlevoorwaarde in een directe paarsgewijze vergelijking.
Percentage positieve bepalingen (Positive Percent Call, PPC)	Percentage positieve observaties voor een doel van de observaties die werden verwacht positief te zijn voor het doel.
Percentage negatieve bepalingen (Negative Percent Call, NPC)	Percentage negatieve observaties voor een target van de observaties die werden verwacht negatief te zijn voor het target.
Algehele procentuele overeenkomst (OPA)	Het percentage van positieven en negatieven die juist zijn geïdentificeerd uit de totale observaties ten opzichte van een orthogonale methode.

Kruisverontreiniging

Het kruisverontreinigingsonderzoek werd uitgevoerd om te evalueren of er fout-positieve resultaten als gevolg van contaminatie tussen de wells tijdens de preparatie van de monsterbibliotheek en contaminatie tussen de runs tussen opeenvolgende sequencing-runs optreden bij de TSO Comprehensive (EU)-assay. Er werden twee DNA- en twee RNA-monsters met unieke en niet-overlappende varianten gebruikt om kruisverontreiniging te evalueren. 32 DNA-bibliotheken en 32 RNA-bibliotheken werden elk drie keer geprepareerd door twee operators in een dambordopstelling met alternerende monsters om de verontreiniging tussen monsterwells te beoordelen, en met alternerende indexen om de sequencing-verontreiniging tussen runs bij opeenvolgende sequencing op hetzelfde NextSeq 550Dx-instrument te beoordelen. Om de kruisverontreiniging te evalueren, werden kleine DNA-varianten (die ook van invloed zijn op TMB) en RNA-varianten geëvalueerd (MSI en genamplificaties werden niet geëvalueerd). Het onderzoek naar kruisverontreiniging van de gedetecteerde varianten in elk monster leverde nul waargenomen gevallen van verontreiniging op. Er werden ook geen fout-positieve resultaten gedetecteerd.

Evaluatie nucleïnezuur-extractiekit

Drie commercieel beschikbare DNA- en RNA-extractiekits werden geëvalueerd met TSO Comprehensive (EU). De drie extractiekits isoleerden zowel DNA als RNA uit dezelfde FFPE-weefselgedeelten. De kits verschilden in deparaffineermiddel en stappen voor het binden van nucleïnezuur (Tabel 39). Kit 1 was de meest gebruikte extractiekit om de prestaties van TSO Comprehensive (EU) te bepalen.

Tabel 39 Kitkenmerken

Kit	Deparaffineermiddel	Binden nucleïnezuur
1	Bedrijfseigen	Kolom
2	Xyleen	Kolom
3	Minerale olie	Magnetische parels

Zeven monsters (5 FFPE-weefsel en 2 FFPE-cellijnen) werden in duplicaat geëxtraheerd door 2 operators, herhaald op 3 dagen voor elk van de 3 extractiekits (7 monsters x 3 extractiekits x 2 extractie-operators x 3 extractiedagen x 2 extractiereplicaten).

Tabel 40 geeft een samenvatting van de effecten van extractiekits op de bibliotheekvaliditeit en de variantbepaling. Voor bibliotheekvaliditeit werd het grootste percentageverschil tussen de extractiekits gerapporteerd en de significantie werd bepaald door een kwantitatieve analyse van de bibliotheekmetrieken. Voor het bepalen van varianten werd, waar de gemiddelden van de extractiekits significant afweken, het verschil gerapporteerd.

Bij extractiekits werd waargenomen dat deze de meetwaarden voor bibliotheekvaliditeit van kleine DNA-varianten/TMB en MSI beïnvloedden. De meetwaarden voor bibliotheekvaliditeit voor genamplificaties en RNA verschilden niet significant tussen de extractiekits. De extractiekits hadden geen invloed op de bepaling van varianten voor kleine DNA-varianten en de TMB-score. Voor de MSI-score en genamplificaties werden geen fout-positieven gedetecteerd en bij een kwantitatieve analyse werden geen significante verschillen in de negatieve monsters aangetroffen. Bij extractiekits werden verschillen waargenomen in de waarden voor ondersteunende aflezingen zodat fusies en splicevarianten nabij LoD konden worden gemist als gevolg van de keuze voor een bepaalde extractiekit.

De geselecteerde extractiekit hoort te worden gebruikt bij de laboratoriumverificatie van de prestatiekenmerken van TSO Comprehensive (EU) en voor het verkrijgen van een adequate bibliotheekvaliditeit.

Tabel 40 Impact van extractiekit op de bibliotheekvaliditeit en de variantbepaling

Varianttype	Percentage bibliotheekvaliditeit (grootste verschil)	Variantbepaling (grootste gemiddelde verschil in onderliggende variabele)
Kleine DNA-varianten	Kit 2 significant lager dan Kit 3 (10%)	Niet significant
TMB		Niet significant
MSI	Kit 1 significant lager dan Kit 3 (14%)	Geen fout-positieven gedetecteerd Fout-negatieven niet geëvalueerd
Genamplificatie	Niet significant (5%)	Geen fout-positieven gedetecteerd Fout-negatieven niet geëvalueerd
Fusies	Niet significant (3%)	Kit1 significant lager dan Kit 3 (11%)
Splicevarianten		Kit1 significant lager dan Kit 3 (11%)

Interfererende stoffen

De invloed van mogelijke endogene en exogene stoffen op de werking van de TSO Comprehensive (EU)-assay werd geëvalueerd op 16 unieke FFPE-monsters van hersen-, schildklier-, colon-, borst-, long- en prostaatweefsel, huid en zachte weefsels. Endogene stoffen, melanine en hemoglobine, werden aan de monsters toegevoegd gedurende het extractieproces voor nucleïnezuur. Tijdens het extractieproces voor nucleïnezuur waren exogene stoffen (ethanol, xyleen, en proteïnase K) aanwezig; deze werden ook in het gezuiverde nucleïnezuur toegevoegd vóór de bibliotheekpreparatie. Het toevoegen van extra proteïnase K tijdens het extractieproces werd ook geëvalueerd waar interferentie werd waargenomen met toegevoegd proteïnase K. Er was een niet-toegevoegde endogene controle en buffer of water-toegevoegde exogene controle voor elk van de 16 unieke monsters. Het effect van necrose werd beoordeeld op een andere set van 8 FFPE-monsters van long-, hersen- en colonweefsel. Er was een controle zonder necrose op macrodissectieniveau voor elk necrosemonster. Voor alle interferenten werden per monster per stof drie replicaties getest met de TSO Comprehensive (EU)-assay en vergeleken met hun respectieve controle voor kleine DNA-varianten, genamplificaties, RNA-fusies en RNA-splicevarianten, alsook voor MSI-status en TMB-score.

Detectie van DNA-varianten

Melanine (0,2 µg/ml), hemoglobine (2 mg/ml), ethanol (5%), proteïnase K (0,04 mg/ml) en xyleen (0,0001%) interfereren niet met de TMB-score, MSI-status, kleine DNA-varianten en genamplificaties.

Detectie van RNA-varianten

De gegevens ondersteunen geen interferentie van hemoglobine (2 mg/ml), melanine (0,2 µg/ml), ethanol (5%) en xyleen (0,0001%) op RNA-fusies of splicevarianten. Evenmin was er interferentie bij de detectie van RNA-varianten wanneer 0,02 mg/ml proteïnase K in RNA werd toegevoegd vóór de bibliotheekpreparatie en wanneer tot 2,6 mg/ml proteïnase K werd toegevoegd aan het monster tijdens het proces van RNA-zuivering.

Tussen replicaatbibliotheken voor RNA-fusies met hemoglobine, melanine, ethanol en xyleen en voor RNA-splitsingsvarianten met melanine en xyleen werden enkele fout-positieven waargenomen ten opzichte van de controles zonder interferenties. Op vergelijkbare wijze werden enkele fout-negatieven waargenomen op enkele replicaatbibliotheken voor RNA-splicevarianten met hemoglobine, melanine, xyleen en 0,02 mg/ml proteïnase K. In alle gevallen werden de vals-positieven en vals-negatieven echter geacht monsterproblemen te zijn omdat de waarnemingen voor gedetecteerde gebeurtenissen ondersteunende aflezingen in de buurt van de LoD lieten zien. Daarom werden fout-positieven en fout-negatieven in de replicaten als niet aan interferentie gerelateerd beschouwd en toegeschreven aan willekeurige variatie van het aantal ondersteunende aflezingen voor fusies en/of splicevarianten op of onder de LoD.

Necrose

De aanwezigheid van necrotisch weefsel tot 70% interfereert niet met de detectie van TMB-score, MSI-status, kleine DNA-varianten of splicevarianten. Het heeft wel invloed op de detectie van RNA-fusies en genamplificaties in monsters met ≥ 25% necrotische inhoud in het weefselgebied. Als het monstergedeelte

meer dan 25% necrotische inhoud bevat in het totale weefselgebied, moet het necrotische weefsel op macrodissectieniveau worden weggesneden.

Stabiliteit

Realtime stabiliteit

Realtime-stabiliteit werd gebruikt om de levensduur van de TSO Comprehensive (EU)-assaykit vast te stellen bij opslag volgens de omstandigheden op het label. De onderzoeksopzet was gebaseerd op het testen van 3 partijen reagentia en maakte gebruik van de klassieke opzet van het stabiliteitsonderzoek zoals beschreven in CLSI EP25-A. De kits werden voor de duur van het onderzoek opgeslagen in de definitieve configuratie, onder de op het productlabel vermelde opslagcondities. Bevroren kitonderdelen werden bewaard bij -15°C tot -25°C, gekoelde kitonderdelen bij 2 °C tot 8 °C, onderdelen op kamertemperatuur bij 15 °C tot 30 °C. De kits werden op bepaalde tijdstippen getest op hun uiterlijk en functionele vrijgavecriteria. Daarnaast werden trends in de variantbepaling en de gemeten QC-gegevens geanalyseerd voor de QC-controle. Voor elk reagens werd de levensduur vastgesteld. De vervaldatums zijn toegewezen op basis van de productiedatum en levensduur. De houdbaarheid van de kit is toegewezen op basis van het vroegst vervallende reagens.

Fysische stabiliteit kit

De fysische stabiliteit van de TSO Comprehensive (EU)-assaykit werd beoordeeld onder standaard gebruiksomstandigheden gedurende de levensduur ter ondersteuning van meermaals gebruik van de kit. De reagenskit werd onderworpen aan meerdere malen vriezen/ontdooien en getest om tot wel 4 maal gebruik van de kit te ondersteunen. Daarnaast werden 8 RNA- en 8 DNA-bibliotheken in totaal 3 keer voorbereid om het maximaal aantal ondersteunde bibliotheken (24 DNA- en 24 RNA-bibliotheken per kit) te testen. Voor alle geteste vries- en dooicycli en tijdspunten werd aan alle criteria voor functionele kitvrijgave voldaan.

Tests van FFPE-monsters met reagentia ≥ 25 maanden oud werden uitgevoerd om de impact van tests tijdens het gebruik op variantbepaling te beoordelen. Een kwalitatieve analyse van gerichte varianten liet zien dat cycli tijdens het gebruik geen invloed hadden op de variantbepaling.

Bibliotheekstabiliteit

De stabiliteit van bibliotheken voorbereid met de TSO Comprehensive (EU)-assay werd beoordeeld aan de hand van 8 FFPE DNA- en 8 FFPE RNA-monsters uit 9 verschillende weefseltypen in drievoud getest in de assay. De bibliotheken van de genormaliseerde bibliotheek (NL) PCR-plaat werden samengevoegd en op dag 0 gesequenced. Het resterende volume van de bibliotheken in de NL PCR-plaat werd bevroren opgeslagen (-25 °C tot -15 °C), en vervolgens opnieuw samengevoegd en op dag 30 gesequenced. Eventuele statistisch significante resultaten voor kleine DNA-varianten tussen dag 0 en dag 30 waren technisch gezien verwaarloosbaar. Er waren geen statistische verschillen tussen de resultaten voor dag 0 en dag 30 voor MSI-status, TMB-score, genamplificaties, RNA-fusies en RNA-splicevarianten. De gegevens laten zien dat bibliotheken gegenereerd uit de TSO Comprehensive (EU)-assay tot wel 30 dagen stabiel zijn bij -25 °C tot -15 °C.

Stabiliteit FFPE -weefsel op een objectglaasje

De stabiliteit van op objectglaasjes geplaatste FFPE-weefsels voor gebruik met de TSO Comprehensive (EU)-assay werd beoordeeld door ze op te delen in FFPE-blokjes (secties van 5 µm) uit 16 unieke monsters die 9 weefseltypen vertegenwoordigen, deze op objectglaasjes te plaatsen, gevolgd door opslag bij kamertemperatuur tot 3 tijdspunten: 1 dag (controle), 4 weken en 8 weken. Nucleïnezuren (zowel DNA als RNA) werden geëxtraheerd op het aangegeven tijdspunt en daarna ingevroren bewaard tot de extracties voor alle tijdspunten voltooid waren. Geëxtraheerd RNA werd bewaard bij -65 °C tot -85 °C en geëxtraheerd DNA werd bewaard bij -15 °C tot -25 °C. Voor elk tijdstip werden drie herhalingen per monster getest met de TSO Comprehensive (EU)-assay en vergeleken met de controle voor kleine DNA-varianten, MSI-status, TMB-score, genamplificaties, RNA-fusies en RNA-splicevarianten. De gegevens laten zien dat op objectglaasjes geplaatste FFPE-weefsels voor gebruik met de TSO Comprehensive (EU)-assay tot wel 4 weken stabiel zijn.

Guardbanding titratie input nucleïnezuur

De input van nucleïnezuur voor de TSO Comprehensive (EU)-assay werd beoordeeld door DNA van 33 FFPE-monsters bestaande uit 17 weefseltypen te testen bij inputniveaus variërend van 10 ng tot 500 ng en door RNA van 5 FFPE-monsters bestaande uit 5 weefseltypen te testen bij inputniveaus variërend van 10 ng tot 85 ng. Meetwaarden voor kwaliteitscontrole bibliotheek werden geëvalueerd en waren monsterafhankelijk. De DNA-resultaten lieten zien dat sommige, maar niet alle, kwaliteitscontrolemetingen van DNA-monsters reageren op een verhoogde input boven de nominale input van 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE reageerde niet op input boven 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE toonde een positieve correlatie bij verhoging van de input.
- PCT_EXON_50X nam toe bij verhogen van input tot 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES nam toe bij verhogen van input. Sommige monsters met minder dan 40 USABLE_MSI_SITES bij 40 ng voldeden aan de specificatie bij hogere inputs, waarbij een MSI-score zou kunnen worden berekend.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET nam toe bij verhogen van input.
- Bij het verhogen van de input neemt COVERAGE_MAD toe in de richting van de bovenste specificatielimiet.

Kwaliteitscontrolewaarden voor RNA-monsters namen toe (MEDIAN_INSERT_SIZE en TOTAL_ON_TARGET_READS) of af (MEDIAN_CV_GENE_500X) van 10 ng tot 40 ng maar veranderden in het algemeen niet bij een input tussen 40 ng en 85 ng.

Blancolimiet

Het percentage fout-positieven (van het totaal aantal verwachte negatieven) werd beoordeeld door replicaattesten van FFPE normaal of benigne, naastgelegen weefsel dat geen somatische varianten zou mogen bevatten voor kleine DNA-varianten, genamplificaties, MSI, RNA-fusies en RNA-splicevarianten. Vals-positieven werden niet geanalyseerd op TMB aangezien er geen klinische grenswaarde is. Zes DNA- en zes RNA-FFPE-monsters werden in duplicaat uitgevoerd door 2 operators in 3 dagen voor elk van de 2

reagenspartijen. Een subset monsters werd opnieuw gepoold en opnieuw gesequencet in een 3x alleen DNA- en een 3x alleen RNA-opzet om het aantal fout-positieven te beoordelen bij verschillende multiplexconfiguraties ondersteund door dit apparaat. Daarnaast werden 30 extra RNA-monsters uitgevoerd in duplicaat die werden verwerkt met 1 reagenspartij, verdeeld tussen 2 operators. In totaal waren er 168 mogelijke observaties voor DNA en 228 observaties voor RNA verminderd met ongeldige bibliotheken voor elk varianttype. Het percentage fout-positieven werd op genniveau berekend voor amplificaties en op het positieve niveau (ongeveer 1,9 miljoen posities) voor kleine DNA-varianten. Het percentage vals-positieven voor DNA-varianttypes wordt weergegeven in Tabel 41. Het percentage fout-positieven voor RNA-fusies en -splicevarianten was 0% zoals weergegeven in Tabel 42.

Tabel 41 Fout-positieven per DNA-varianttype

Varianttype	Fout-positieven
Genamplificaties	0% (0/9912)
Kleine DNA-varianten	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	N.v.t.*

* Vals-positieven zijn niet van toepassing omdat de TMB wordt gerapporteerd als een score en geen kwalitatief resultaat heeft.

Tabel 42 Vals-positieven per RNA-varianttype

Varianttype	Fout-positieven
Fusie	0% (0/226)
Splicevariant	0% (0/226)

Detectielimiet

Er werden twee onderzoeken uitgevoerd om de detectielimieten voor TSO Comprehensive (EU) te beoordelen. Onderzoek 1 evalueerde RET kleine DNA-varianten, RET-fusies en NTRK1-3-fusies. Onderzoek 2 evalueerde andere tumorprofileringsvarianten.

Onderzoek 1

De detectielimieten (LoD's) van NTRK1, NTRK3 en RET kleine DNA-varianten en NTRKA1-3 en RET-fusies werden bepaald. De LoD is de laagste analytwaarde (bijv. variantallelfrequentie of ondersteunende aflezingen) die consistent kan worden gedetecteerd (detectielimiet 95% of een type II-fout van 5%). In het onderzoek werden FFPE-weefsels met RET kleine DNA-varianten (medullair schildkliercarcinoom), RET-fusies (papillair schildkliercardinoom, atypische Spitz-tumor) en NTRK1-3-fusies (laaggradig glioom, glioblastoma multiforme, myofibroblastisch sarcoom, sarcoom, secretoir borstcarcinoom, coloncarcinoom) en een FFPE-behandelde cellijn met NTRK1 en NTRK3 kleine DNA-varianten gebruikt. Elk monster is verdund tot ten minste 5 testniveaus (variërend van ongeveer 0,01 tot 0,10 voor kleine DNA-varianten en ongeveer 2-25 ondersteunende aflezingen

voor fusies). Er waren 18 waarnemingen voor elk testniveau per partij per variant gegenereerd door 3 operators en 3 sequencing-instrumenten die bibliotheekpreparatie initieerden op 3 niet-opeenvolgende dagen met 2 replicaten van elk monstertestniveau. Er werden twee reagenspartijen getest.

Voor DNA-varianten werden de 2 partijen onafhankelijk geanalyseerd met probit-regressie of de trefpercentagebenadering (laatste testniveau met een trefpercentage (puntenschatting) van ≥ 95%) om de LoD voor elke variant per partij te bepalen. De grotere LoD van de twee reagenspartijen werd genomen als detectielimiet voor de variant (Tabel 43).

Voor RNA-fusies werden FFPE-cellijnen gebruikt om de LoD-waarden te schatten voor elk fusiegen. De LoD's werden hierna geverifieerd met FFPE-weefsels met behulp van duplicaat-bibliotheekpreparaties met 3 operators, 3 instrumenten en 3 reagenspartijen om 54 observaties per variant nabij de LoD vastgesteld met FFPE-cellijnen te genereren. De geclaimde detectielimieten voor elke fusie (Tabel 44) zijn de laatste gemiddelde ondersteunende aflezingen die een trefpercentage (puntenschatting) van ≥ 95% hebben bereikt.

Tabel 43 Detectielimiet voor NTRK1, NTRK3 en RET kleine DNA-varianten

Markering	Chromosoom	Positie	Referentie	Alternatief	Detectielimiet (variantallelfrequentie).
NTRK1 G595R (SNV)*	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV)*	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV)*	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV)*	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (deletie)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

* Deze DNA-varianten werden geanalyseerd op probit-regressie; de andere DNA-varianten werden geanalyseerd met de trefpercentagebenadering.

Tabel 44 Detectielimiet voor NTRK- en RET-fusies

Gen	Fusie	Detectielimiet (ondersteunende aflezingen)
NTRK1	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	ETV6-NTRK2	20,3
	STRN-NTRK2	13,6
NTRK3	ETV6-NTRK3	16,2
	KANK1-NTRK3	13,5
RET	NCOA4-RET	15,8
	CCDC6-RET	18,7
	KIF5B-RET	16,6

Onderzoek 2

De detectielimieten (LoD's) van tumorprofileringsvarianten gerapporteerd door TSO Comprehensive (EU) werden beoordeeld. De LoD is de laagste analytwaarde (bijv. variantallelfrequentie, fold change of ondersteunende aflezingen) die consistent kan worden gedetecteerd (detectielimiet 95% of een type II-fout van 5%). FFPE-monsters van 17 weefseltypen met varianten werden verdund tot meerdere testniveaus. Per niveau werden zes waarnemingen gegenereerd door twee operators die elk een verschillende reagenspartij en instrument gebruikten.

DNA-varianten

De LoD's van 10 kleine DNA-variantklassen (25 varianten in totaal) en 2 DNA-genamplificaties (ERBB2 en MET) werden bepaald en samengevat als bereiken (Tabel 45). RET-varianten van het andere detectielimietonderzoek zijn ook opgenomen. Twee van de drie inserties van meer dan 5 bp hadden LoD's van 0,034 en 0,036, terwijl de derde een LoD van 0,215 had. De laatste was een insertie in een laagcomplexe regio waar de insertie extra herhalingen toevoegt, de uitlijning beïnvloedt en meer lezingen vereist voor consistente detectie. Derhalve kunnen sommige genomische contexten met lage complexiteit de detectie van inserties van > 5 bp beïnvloeden.

Tabel 45 Detectielimiet voor kleine DNA-varianten en genamplificaties.

Type (meeteenheid voor LoD)	Variantklasse/genomische context	Aantal varianten	Bereik
Kleine DNA-varianten (allelfrequentievariant)	SNV's	5	0,016–0,064
	MNV's	3	0,022–0,048
	Insertie (1-2 bp) bijna-homopolymeerherhalingen	2	0,086–0,104
	Insertie (1-2 bp) bijna-dinucleotideherhalingen	2	0,038–0,051
	Insertie (3-5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertie (> 5 bp en tot 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deletie (1-2 bp) bijna-homopolymeerherhalingen	2	0,094–0,100
	Deletie (1-2 bp) bijna-dinucleotideherhalingen	2	0,033–0,070
	Deletie (3-5 bp)	2	0,028–0,064
	Deletie (> 5 en tot 25 bp)	2	0,047–0,055
Genamplificaties (fold change)	Op gen (ERBB2, MET)	2	2,034–2,195

Fusies

LoD's werden bepaald voor 18 fusies, goed voor 20 genen in het TSO Comprehensive (EU)-panel, die varieerden van 10 tot 54,7 ondersteunende aflezingen (Tabel 46). In het andere LoD-onderzoek werden nog eens 3 genen (NTRK1-3) getest. Hier en in het andere LoD-onderzoek werd getest op het RET-gen. Zestien fusies met bepaalde LoD's hadden gegevens die consistent waren met een gemeenschappelijke LoD van 16 ondersteunende aflezingen met behulp van een tweezijdige hoogste betrouwbaarheidsgrens (upper confidence limit, UCL) van 95%. Twee fusies hadden een LoD van 24,7 en 44,2 ondersteunende aflezingen die niet consistent waren met de gemeenschappelijke LoD.

De fusie FGFR2-SRPK2 met een LoD-waarde van 24,7 ondersteunende aflezingen had herhaaldelijk overlapregio's in het breekpunt, zoals geannoteerd door de assay-software. Herhalingsregio's binnen een breekpunt hebben doorgaans bewijskrachtniveaus omdat aflezingen elders het genoom kunnen voorkomen of niet-uitgelijnd kunnen blijven. Bovendien maken herhalingsregio's het assemblageproces (dat wordt gebruikt om fusiesequenties te identificeren) moeilijker en is extra bewijsmateriaal nodig om de juiste sequentie te construeren. SEPT14-EGFR is een ander voorbeeld van een fusie met homologe sequentie in het breekpunt.

De fusie BCL2-IGHJ5 met een LoD-waarde van 44,2 ondersteunde aflezingen had een heel kort gen (IGHJ5) met het breekpunt dicht bij het begin van een exon waardoor korte uitlijningen met hiaten nodig waren. Als gevolg daarvan waren er meer aflezingen nodig voor een consistente detectie.

Tabel 46 Detectielimiet voor fusies

Fusie	Breekpunt gen A	Breekpunt gen B	LoD	Gemeenschappelijke LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	10	ja
TMPRSS2-ERG	39817543	42880007	13,2	ja
KIF5B-RET	32311775	43612032	14,5	ja
ACPP-ETV1	132036419	14028762	17,2	ja
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ja
EML4-ALK	29446394	42553391	20,2	ja
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ja
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	24	ja
ESR1-CCDC170	151857451	152023138	24,3	ja
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nee
HNRNPUL1-AXL	41743847	41782201	26,3	ja
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	28,2	ja
SPIDR-NRG1	32453345	48353103	28,2	ja
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	28,5	ja
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	30,5	ja
MKRN1-BRAF	140487383	140158806	31,2	ja
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	44,2	nee
PAX3-FOXO1	41134997	223084859	54,7	ja

Splicevarianten

De 2 RNA-splicevarianten - MET en EGFR - hadden een LoD van respectievelijk 18,7 en 24,8.

Tumorinhoud

De resultaten van het onderzoek geven aanbevelingen voor tumorinhoud voor klinische monsters. In het algemeen geldt dat hoe groter de tumorinhoud, hoe groter het 'signaal' (VAF, fold change of ondersteunende aflezingen) voor varianten in de tumor. Minimale aanbevelingen voor tumorinhoud zijn gebaseerd op de volgende waarnemingen. LoD-waarden voor kleine DNA-varianten zijn niet groter dan 0,104 (met uitzondering van de TP53-insertie). Voor het detecteren van drivermutaties in de tumor (0,50 variante allelfrequentie) wordt 20% tumorinhoud aangeraden, zodat deze mutaties 0,10 VAF's zouden hebben en op of boven LoD zouden

liggen. Bij 20% tumorinhoud zouden genen die zijn geamplificeerd tot 5,5 fold change (11 kopieën) consistent worden gedetecteerd op basis van een detectielimiet van 1,8 fold change. Bij 20% tumorinhoud zouden fusies met 80 ondersteunende aflezingen consistent worden gedetecteerd op basis van een detectielimiet van 16 ondersteunende aflezingen.

Reproduceerbaarheid

Er werden twee onderzoeken uitgevoerd om de reproduceerbaarheid voor de TSO Comprehensive (EU)-assay te evalueren. Onderzoek 1 evalueerde RET kleine DNA-varianten naast NTRK- en RET-fusies. Onderzoek 2 evalueerde aanvullende tumorprofileringsvarianten.

Onderzoek 1

Dit onderzoek werd uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de TSO Comprehensive (EU)-assay tussen 3 testlocaties (1 interne, 2 externe) met 2 operators per locatie, 2 replicaten binnen een run en 3 niet-opeenvolgende testdagen te beoordelen. Tests werden uitgevoerd met een reproduceerbaarheidspanel inclusief DNA-monsters met specifieke bekende RET kleine DNA-varianten en RNA-monsters met specifieke bekende NTRK1-3- en RET-fusievarianten van in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE-)weefselspecimens en -cellijnen. Het panel bevatte DNA- en RNA-panelleden met lage variantniveaus en hoge variantniveaus met hetzelfde aantal lage en hoge panelleden voor elke variantklasse. Er werd gericht op panelleden op hoog niveau bij ongeveer 2 tot 3 keer het LoD-niveau en er werd gericht op panelleden op laag niveau bij ongeveer de LoD. Bij elke locatie testte elke operator de panelleden 3 maal in tweevoud, waarbij 6 observaties per gericht panellid werden gegenereerd. Vanaf alle 3 locaties werden 36 observaties per panellid gegenereerd (3 locaties/instrumenten × 2 operators × 2 replicaten binnen een run × 3 startdagen).

Percentage positieve bepalingen (PPC) en percentage negatieve bepalingen (PNC) voor gerichte kleine DNA-varianten en gerichte RNA-fusievarianten op hoog niveau werden berekend als primaire eindpunten. PPC's en PNC's voor gerichte kleine DNA-varianten en gerichte RNA-fusievarianten op laag niveau werden berekend als secundaire eindpunten. Tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI's) geassocieerd met alle eindpunten werden berekend met behulp van de Wilson-scoremethode. Er werden primaire analyses uitgevoerd om PPC en PNC te schatten (met bijbehorende 95%-BI's) bij gerichte panelleden van hoog niveau door observaties van de TSO Comprehensive (EU)-assay voor een bepaald doel in een groep panelleden die de van toepassing zijnde variantklasse vertegenwoordigen (zoals kleine DNA-varianten en RNA-fusies) te combineren tussen locaties/instrumenten, operators en runs. Voor elke doelvariant werden TSO Comprehensive (EU)-assayobservaties bij andere panelleden op hoog niveau, die gericht waren op hetzelfde varianttype, maar niet dezelfde variant bevatten als bepaald door de meerderheidsregel, gecombineerd tot het berekende PNC. Het totale PPC en PNC voor de gerichte panelleden van laag niveau werden op een soortgelijke manier vastgesteld.

RET kleine DNA-varianten

Voor de panelleden met een klein DNA-variant op hoog niveau was het totale PPC 100,0% (207/207; 95%-BI: 98,2% tot 100,0%) (Tabel 47). Het totale PNC voor de panelleden met een kleine DNA-variant op hoog niveau was 100,0% (1035/1035; 95%-BI: 99,6% to 100,0%) (Tabel 48). Voor panelleden met gerichte kleine DNA-

varianten op laag niveau was het totale PPC voor de panelleden met gerichte kleine DNA-varianten op laag niveau 99,1% (210/212; 95%-BI: 96,6% tot 99,7%), en het totale PNC was 100,0 % (1026/1026; 95%-BI: 99,6% tot 100,0%).

Tabel 47 PPC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van RET kleine DNA-varianten bij gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variant-niveau	Variant-type	Doelvariant (Nucleotide)	Doelvariant (Aminozuur)	n	Gemid-delde VAF	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI*
Hoog	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Hoog	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Hoog	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Hoog	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Hoog	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	Alle kleine DNA-varianten hoog	Alle kleine DNA-varianten hoog	Alle kleine DNA-varianten hoog	207	N.v.t.	100,0% (207/207)	(98,2%, 100,0%)
Laag	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Laag	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)
Laag	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Laag	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)

Variant-niveau	Variant-type	Doelvariant (Nucleotide)	Doelvariant (Aminozuur)	n	Gemid-delde VAF	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI*
Laag	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Laag	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Laag	Alle kleine DNA-varianten laag	Alle kleine DNA-varianten laag	Alle kleine DNA-varianten laag	212	N.v.t.	99,1% (210/212)	(96,6%, 99,7%)

Afkortingen: N.v.t., niet van toepassing; VAF, variantallelfrequentie.
* 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 48 PNC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van RET kleine DNA-varianten bij gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Varianttype	Doelvariant (Nucleotide)	Doelvariant (Aminozuur)	n[1]	Percentage negatieve bepalingen (%)	95%-BI[2]
Hoog	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0% (173/173)	(97,8%, 100,0%)
Hoog	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Hoog	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Hoog	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0% (172/172)	(97,8%, 100,0%)
Hoog	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Hoog	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)

Variantniveau	Varianttype	Doelvariant (Nucleotide)	Doelvariant (Aminozuur)	n[1]	Percentage negatieve bepalingen (%)	95%-BI[2]
Hoog	Alle kleine DNA-varianten hoog	Alle kleine DNA-varianten hoog	Alle kleine DNA-varianten hoog	1035	100,0% (1035/1035)	(99,6%, 100,0%)
Laag	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Laag	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0% (143/143)	(97,4%, 100,0%)
Laag	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Laag	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Laag	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0% (178/178)	(97,9%, 100,0%)
Laag	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Laag	Alle kleine DNA-varianten laag	Alle kleine DNA-varianten laag	Alle kleine DNA-varianten laag	1026	100,0% (1026/1026)	(99,6%, 100,0%)

[1] Alle observaties gepoold uit panellid-variantcombinaties waarvoor de meerderheid van de bepalingen negatief is, d.w.z. doelvarianten met daarin fusies met minder dan 50% van de bepalingen positief.
[2] 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 49 toont de variantiecomponentenanalyse van variantallelfrequenties (VAF's) over de ongeveer 36 observaties voor elk panellid. De standaarddeviatie (SD) en procentuele variatiecoëfficiënt (%CV; totaal en voor elke bron) werden berekend en worden voor elke RET kleine DNA-doelvariant getoond.

Tabel 49 Variantiecomponentenanalyse met TSO Comprehensive (EU)-assay van VAF in panelleden met kleine DNA-doelvarianten

Variantniveau	Variantype	Doelvariant (Nucleotide)	Doelvariant (Aminozuur)	n	Gemiddelde VAF	Locatie SD (%CV)	Operator SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Replicaat SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
Hoog	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,017 (10,8%)	0,020 (13,0%)
Hoog	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6%)	0,000 (0,0%)	0,005 (3,7%)	0,014 (10,2%)	0,017 (11,8%)
Hoog	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1%)	0,000 (0,0%)	0,002 (1,7%)	0,012 (10,7%)	0,013 (11,6%)
Hoog	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,009 (4,4%)	0,012 (6,0%)	0,015 (7,5%)
Hoog	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,011 (5,5%)	0,017 (8,6%)	0,020 (10,2%)
Hoog	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,009 (9,6%)	0,010 (10,1%)
Laag	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,009 (22,2%)	0,009 (22,2%)
Laag	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0%)	0,003 (9,8%)	0,002 (6,2%)	0,007 (21,7%)	0,008 (24,6%)
Laag	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,008 (17,5%)	0,008 (18,5%)
Laag	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0%)	0,008 (10,7%)	0,000 (0,0%)	0,011 (14,9%)	0,013 (18,4%)
Laag	Deletie	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	0,002 (2,5%)	0,006 (9,9%)	0,004 (6,4%)	0,010 (16,2%)	0,013 (20,2%)
Laag	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8%)	0,000 (0,0%)	0,003 (9,1%)	0,006 (15,9%)	0,008 (22,9%)

NTRK 1-3 en RET-fusies

Bij de RNA-fusiepanelleden van het hoge niveau was de totale PPC 99,3% (285/287; 95%-BI: 97,5% tot 99,8%) (Tabel 50). Het PPC was 100% voor alle panelleden van hoog niveau met uitzondering van het BCAN-NTRK1-panellid (PPC = 94,4% [34/36; 95%-BI: 81,9% tot 98,5%]). Het totale PNC voor de RNA-fusiepanelleden van hoog niveau was 100,0% (1724/1724; 95%-BI: 99,8% tot 100,0%) (Tabel 51). Voor de gerichte RNA-fusiepanelleden van laag niveau was het totale PPC 95,4% (272/285; 95%-BI: 92,3%, 97,3%) en het totale PNC was 100,0% (1851/1851; 95%-BI: 99,8% tot 100,0%).

Tabel 50 PPC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van NTRK- en RET-fusies bij gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Gerichte fusie	n	Gemiddelde ondersteunende aflezingen	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI*
Hoog	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Hoog	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Hoog	NCOA4-RET	36	36,7	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	CCDC6-RET	36	33,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Hoog	Alle fusies hoog	287	36,5	99,3% (285/287)	(97,5%, 99,8%)
Laag	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Laag	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6% (29/36)	(65,0%, 90,2%)

Variantniveau	Gerichte fusie	n	Gemiddelde ondersteunende aflezingen	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI*
Laag	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)
Laag	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Laag	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Laag	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Laag	NCOA4-RET	36	15,8	97,2% (35/36)	(85,8%, 99,5%)
Laag	KIF5B-RET	34	16,6	97,1% (33/34)	(85,1%, 99,5%)
Laag	Alle fusies laag	285	16,8	95,4% (272/285)	(92,3%, 97,3%)

* 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval (BI) berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 51 PNC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van NTRK- en RET-fusies bij niet-gerichte panelleden van hoog en laag niveau

Variantniveau	Gerichte fusies	n[1]	Percentage negatieve bepalingen (%)	95%-BI[2]
Hoog	LMNA-NTRK1	180	100,0% (180/180)	(97,9%, 100,0%)
Hoog	BCAN-NTRK1	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Hoog	ETV6-NTRK2	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Hoog	TRIM24-NTRK2	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Hoog	ETV6-NTRK3	144	100,0% (144/144)	(97,4%, 100,0%)
Hoog	BTBD1-NTRK3	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)

Variantniveau	Gerichte fusies	n[1]	Percentage negatieve bepalingen (%)	95%-BI[2]
Hoog	NCOA4-RET	215	100,0% (215/215)	(98,2%, 100,0%)
Hoog	CCDC6-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Hoog	Alle fusies - Hoog	1724	100,0% (1724/1724)	(99,8%, 100,0%)
Laag	LMNA-NTRK1	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Laag	BCAN-NTRK1	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Laag	ETV6-NTRK2	250	100,0% (250/250)	(98,5%, 100,0%)
Laag	STRN-NTRK2	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Laag	ETV6-NTRK3	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Laag	BTBD1-NTRK3	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Laag	NCOA4-RET	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Laag	KIF5B-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Laag	Alle fusies - Laag	1851	100,0% (1851/1851)	(99,8%, 100,0%)

[1] Alle observaties gepoold uit panellid-variantcombinaties waarvoor de meerderheid van de bepalingen negatief is, d.w.z. doelvarianten met daarin fusies met minder dan 50% van de bepalingen positief.
[2] 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval (BI) berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 52 toont de variantiecomponentenanalyse van ondersteunende aflezingen tussen de ongeveer 36 observaties binnen elke gerichte fusie. De SD en het %CV (totaal en voor elke bron) werden berekend en gepresenteerd voor elke gerichte fusie.

Tabel 52 Variantiecomponentenanalyse met TSO Comprehensive (EU)-assay van ondersteunende aflezingen in gerichte RNA-fusiepanelleden

Variant-niveau	Fusie	n	Gemiddelde ondersteunende aflezingen	Locatie SD (%CV)	Operator SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Replicaat SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
Hoog	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9%)	3,37 (9%)	6,93 (18%)	9,04 (24%)	12,39 (33%)
Hoog	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41%)	7,87 (23%)	5,40 (16%)	8,95 (27%)	18,98 (57%)
Hoog	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33%)	3,50 (14%)	4,20 (17%)	4,86 (20%)	10,86 (44%)
Hoog	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31%)	4,24 (12%)	6,82 (19%)	6,87 (19%)	15,57 (43%)
Hoog	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20%)	10,20 (18%)	9,25 (16%)	8,69 (15%)	19,93 (35%)
Hoog	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5%)	2,65 (8%)	2,16 (7%)	10,47 (32%)	11,11 (34%)
Hoog	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13%)	4,09 (11%)	6,17 (17%)	5,20 (14%)	10,17 (28%)
Hoog	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22%)	2,56 (8%)	6,53 (20%)	5,51 (16%)	11,49 (34%)
Laag	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13%)	0,00 (0%)	2,74 (20%)	4,37 (32%)	5,47 (40%)
Laag	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17%)	2,98 (18%)	4,61 (27%)	5,82 (34%)	8,52 (50%)
Laag	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0%)	3,41 (22%)	3,83 (25%)	4,39 (29%)	6,75 (45%)
Laag	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13%)	0,61 (5%)	2,33 (17%)	2,57 (19%)	3,95 (29%)
Laag	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24%)	3,46 (14%)	0,00 (0%)	6,39 (26%)	9,44 (38%)
Laag	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	6,64 (37%)	6,71 (37%)
Laag	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13%)	1,03 (7%)	0,00 (0%)	5,11 (32%)	5,61 (36%)

Variant-niveau	Fusie	n	Gemiddelde ondersteunende aflezingen	Locatie SD (%CV)	Operator SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Replicaat SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
Laag	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12%)	0,00 (0%)	1,58 (10%)	5,83 (35%)	6,39 (39%)

%CV: Procentuele variatiecoëfficiënt.
SD: Standaarddeviatie.

Onderzoek 2

Er werd een tweede onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de TSO Comprehensive (EU)-assay te beoordelen voor 3 testlocaties (2 externe en 1 interne), 2 operators/instrumenten per locatie, 3 unieke reagenspartijen, 4 testdagen (niet-opeenvolgend) en 2 sequencing-runs per monsterbibliotheek.

De tests werden uitgevoerd met geëxtraheerde DNA- en RNA-monsters van 41 FFPE-weefselspecimens en 1 FFPE-cellijn (met 1 FFPE-weefselspecimen en de FFPE-cellijn gebruikt om voor elk 2 panelleden te creëren). Weefselspecimens bestonden uit de volgende typen: blaas, bot, hersenen, borst, dikke darm, jejunum, nier, lever, long, eierstok, prostaat, huid, zacht weefsel, maag, schildklier en baarmoeder. Er werden in totaal 44 panelleden getest, waaronder DNA-panelleden met kleine DNA-varianten (SNV's, MNV's, inserties en deleties), genamplificaties, verschillende TMB-scores, hoge MSI-scores en RNA-panelleden met genfusies en splicevarianten. De meeste panelleden hadden bekende gerichte varianten bij niveaus van ongeveer 2 tot 3 keer de variant-specifieke detectielimiet (~2-3×LoD).

De LoD is de analytconcentratie waarbij waargenomen assayresultaten ≥ 95% van de tijd ‘positief’ zijn (variant gedetecteerd ten opzichte van de grenswaarde van de TSO Comprehensive (EU)-assay). De gemiddelde waargenomen variantniveaus werden gecategoriseerd als ongeveer < 2× LoD (waargenomen variantniveaus bij < 1,5× LoD), ~2-3 ×LoD (waargenomen variantniveaus bij 1,5× LoD tot 3,4× LoD) en ongeveer > 3× LoD (waargenomen variantniveaus bij > 3,4× LoD).

Percentage positieve bepalingen (PPC's) voor kleine DNA-varianten, genamplificaties, MSI-High (MSI-H) en RNA-varianten werden berekend door observaties tussen sequencing-runs en locaties te combineren. Percentage negatieve bepalingen (PNC's) werden op dezelfde manier berekend voor kleine DNA-varianten, genamplificaties en RNA-varianten. Voor elke bekende gerichte variant werden TSO Comprehensive (EU)-assayobservaties bij panelleden van hetzelfde varianttype maar met andere varianten, die niet waren afgeleid van hetzelfde bronspecimen en die niet voldeden aan de meerderheidsregel voor die variant (d.w.z. < 50% van de bepalingen waren positief), gecombineerd tussen locaties, operators/instrumenten, dagen, reagenspartijen en sequencing-runs om het PNC te berekenen. Tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI's) werden berekend met behulp van de Wilson-scoremethode.

Kleine DNA-varianten

Tabel 53 toont PPC's voor gerichte kleine DNA-varianten. PPC's varieerden van 91,3% voor een BRAF SNV tot 100% voor de meerderheid van kleine DNA-varianten.

Tabel 53 PPC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van kleine DNA-varianten bij gecombineerde gerichte panelleden

Waar-genomen variant-niveau[1]	Variant-type	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (aminozuur)	Gemid-delde VAF[2]	Per-centage positieve bepalingen (%)	95%-BI[3]
~2-3x LoD	DELETIE	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0% (28/28)	(87,9%, 100,0%)
~2-3x LoD	DELETIE	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0% (40/40)	(91,2%, 100,0%)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
< 2x LoD	INSERTIE	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0% (4/4)	(51,0%, 100,0%)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3% (42/46)	(79,7%, 96,6%)
~2-3x LoD	DELETIE	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
~2-3x LoD	DELETIE	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3x LoD	DELETIE	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)

Waar-genomen variant-niveau[1]	Variant-type	Doelvariant (nucleotide)	Doelvariant (aminozuur)	Gemid-delde VAF[2]	Per-centage positieve bepalingen (%)	95%-BI[3]
< 2x LoD	INSERTIE	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0% (2/2)	(34,2%, 100,0%)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

[1] Variantniveau berekend aan de hand van gemiddelde waargenomen variantallelfrequentie.
[2] Gemiddelde variantallelfrequentie berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.
[3] 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

PNC's waren 100% bij kleine DNA-varianten.

Tabel 54 toont de variantiecomponentanalyse van VAF-resultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden met gerichte kleine DNA-varianten.

Tabel 54 Variantiecomponentenanalyse van VAF voor gerichte kleine DNA-varianten

Doelvariant	N	Gemid-delde VAF	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)

Doelvariant	N	Gemid-delde VAF	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	46	0,112	0,000 (0,0)	0,004 (3,8)	0,015 (13,7)	0,005 (4,1)	0,008 (6,9)	0,018 (16,3)
chr7_55259515_T_G	38	0,045	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,012 (27,3)	0,000 (0,0)	0,003 (6,8)	0,013 (28,8)
chr7_140453136_A_T	46	0,045	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (34,9)	0,000 (0,0)	0,006 (12,2)	0,017 (36,9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0,130	0,000 (0,0)	0,004 (2,9)	0,017 (13,4)	0,003 (2,6)	0,006 (4,9)	0,019 (14,8)
chr9_139399350_C_CG	48	0,146	0,015 (10,2)	0,000 (0,0)	0,012 (8,2)	0,000 (0,0)	0,004 (2,8)	0,020 (13,4)
chr10_89720798_GTACT_G	44	0,157	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,021 (13,6)	0,002 (1,6)	0,010 (6,4)	0,024 (15,3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0,111	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (16,8)	0,003 (2,5)	0,008 (7,3)	0,020 (18,5)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Er waren 2 gerichte kleine DNA-varianten waarvoor het aantal observaties te klein was voor het toepassen van een variantiecomponentenmodel. Bij deze 2 gerichte varianten waren de totale SD's 0,027 voor variant chr1_27024001_C_CG en 0,001 voor variant chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genamplificaties

Tabel 55 toont PPC's voor gerichte genamplificaties. PPC's waren 100,0% voor MET en 100,0% voor ERBB2.

Tabel 55 PPC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van genamplificaties bij gecombineerde gerichte panelleden

Waargenomen variantniveau[1]	Doelvariant	Gemiddelde waargenomen fold-change[2]	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI[3]
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
< 2x LoD	ERBB2	2,33	100,0% (47/47)	(92,4%, 100,0%)

[1] Variantniveau berekend aan de hand van gemiddelde waargenomen fold-change.
[2] Gemiddelde fold-change berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.
[3] 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

PNC's waren 100% bij genamplificaties.

Tabel 56 toont de variantiecomponentanalyse van fold-change-resultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden met gerichte genamplificaties.

Tabel 56 Variantiecomponentenanalyse van fold-change voor gerichte genamplificaties

Doelvariant	N	Gemiddelde fold-change	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabel 57 toont PPC's voor gerichte MSI-H-panelleden. PPC's waren 100% voor beide MSI-H-panelleden.

Tabel 57 PPC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van MSI-H-status bij gecombineerde gerichte panelleden

Panellid	Gemiddelde MSI-score[1]	N	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI[2]
TPSBD4	60,5	36	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
TPSBD6	55,7	32	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)

Panellid	Gemiddelde MSI-score[1]	N	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI[2]
Alle leden		68	100,0% (68/68)	(94,7%, 100,0%)

[1] Gemiddelde waargenomen MSI-score berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.
[2] 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Tabel 58 toont de variantiecomponentanalyse van MSI-scoreresultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden gericht op MSI-H-status.

Tabel 58 Variantiecomponentenanalyse van MSI-score voor gerichte MSI-H-panelleden

Panellid	N	Gemiddelde MSI-score	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

Ter beoordeling van de reproduceerbaarheid van TMB-scores werd een kwantitatieve analyse van de score uitgevoerd bij gerichte TMB-panelleden, wat een bereik van verwachte TMB-scores vertegenwoordigde. Tabel 59 toont de variantiecomponentanalyse van TMB-scoreresultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij de TMB-panelleden. Totale SD's van TMB-score waren 1,0 (%CV = 13) voor één panellid (gemiddelde TMB-score = 7,6) en 1,1 (%CV = 2) voor een ander panellid (gemiddelde TMB-score = 63,2).

Tabel 59 Variantiecomponentenanalyse van TMB-score voor gerichte TMB-panelleden

Panellid	N	Gemiddelde TMB-score	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

Er was 1 TMB-panellid waarvoor het aantal observaties te klein was (N = 2) voor het toepassen van een variantiecomponentenmodel. Voor dit panellid was de totale SD 1,7.

RNA-varianten

Tabel 60 toont PPC's voor gerichte RNA-varianten. PPC's varieerden van 91,7% voor KIF5B-RET tot 100% voor de meerderheid van RNA-varianten.

Tabel 60 PPC van TSO Comprehensive (EU)-assay voor detectie van RNA-varianten bij gecombineerde gerichte panelleden

Waargenomen variantniveau[1]	Varianttype	Doelvariant	Gemiddelde ondersteunende aflezingen[2]	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI[3]
~2-3x LoD	Fusie	ACPP-ETV1	44,7	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	EGFR-GALNT13	49,8	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	EML4-ALK	49,3	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	ESR1-CCDC170	45,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	FGFR1-GSR	61,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	FGFR3-TACC3	53,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
< 2x LoD	Fusie	KIF5B-RET	11,6	91,7% (44/48)	(80,4%, 96,7%)
< 2x LoD	Fusie	MKRN1-BRAF	33,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
< 2x LoD	Fusie	PAX3-FOXO1	70,1	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
< 2x LoD	Fusie	RAF1-VGLL4	15,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)

Waargenomen variantniveau[1]	Varianttype	Doelvariant	Gemiddelde ondersteunende aflezingen[2]	Percentage positieve bepalingen (%)	95%-BI[3]
~2-3x LoD	Fusie	SPIDR-NRG1	51,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3x LoD	Fusie	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9% (47/48)	(89,1%, 99,6%)
~2-3x LoD	Splicevariant	EGFR vIII	64,0	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3x LoD	Splicevariant	MET exon 14-skipping	61,2	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

[1] Variantniveau berekend aan de hand van gemiddelde waargenomen ondersteunende aflezingen.
[2] Gemiddelde ondersteunende aflezingen berekend aan de hand van waargenomen assayresultaten.
[3] 95% tweezijdig betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

PNC was 100% voor elke gerichte RNA-variant, behalve voor de FGFR2-SRPK2-fusie (PNC = 99,60% (984/988; 95%-BI: 98,96% tot 99,84%).

Tabel 61 toont de variantiecomponentanalyse van ondersteunende aflezingsresultaten voor elke bron van variatie en totale variatie bij alle panelleden met gerichte RNA-varianten.

Tabel 61 Variantiecomponentenanalyse van ondersteunende aflezingen voor gerichte RNA-varianten

Doelvariant	N	Gemiddelde onder-steunende aflezingen	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)

Doelvariant	N	Gemiddelde onder-steunende aflezingen	Locatie SD (%CV)	Operator (Locatie) SD (%CV)	Dag (Locatie, Operator) SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Run SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII-splicevariant	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET exon 14-skipping splicevariant	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Intralaboratoriumprecisie

Er werden twee onderzoeken uitgevoerd om de intralaboratoriumprecisie voor TSO Comprehensive (EU) te evalueren. Onderzoek 1 evalueerde NTRK- en RET-fusies en RET kleine DNA-varianten. Onderzoek 2 evalueerde TMB en MSI.

Onderzoek 1

Intralaboratoriumprecisie werd geëvalueerd voor NTRK1-3-fusies (glioom van lagere graad, glioblastoma multiforme, myofibroblastisch sarcoom, secretoire borstkanker), RET-fusies (schildklierkanker en huidweefsel van een onbekende kanker) en RET kleine DNA-varianten (medullaire schildklierkanker) met FFPE-weefsels van de aangegeven kankers. Elk monster werd getest bij twee variantniveaus: ~1x LoD (laag variantniveau) en ~2-3x LoD (hoog variantniveau) met de uitzondering van het monster met CCDC6-RET, wat alleen is getest op het lage variantniveau. Alle monsters werden op elk testniveau uitgevoerd in duplicaten in elke bibliotheekpreparatiecyclus door drie (3) operators. Elke operator begon de bibliotheekpreparatie op drie (3) niet-achtereenvolgende startdagen en sequenceten op drie (3) aangewezen NextSeq 550Dx-instrumenten. Er werden drie (3) reagenspartijen getest, waarbij 54 observaties per niveau werden gegenereerd. Sommige niveaus hadden minder dan 54 observaties als gevolg van ongeldige bibliotheken.

Kwalitatieve analyse

De kwalitatieve concordantie van het bepalen van varianten werd apart geëvalueerd voor de twee variantniveaus voor een gegeven variant uit gepoolde waarnemingen over alle variabelen (operators, reagenspartijen, instrumenten, dagen en replicaten). Het percentage positieve bepalingen (PPC) en het percentage negatieve bepalingen (PNC) en het bijbehorende tweezijdige betrouwbaarheidsinterval van 95% (Wilson-score) worden samengevat in Tabel 62 (kleine DNA-varianten) en Tabel 63 (RNA-fusies).

Bij het hoogste variantniveau (~2-3x LoD) liet de TSO Comprehensive (EU)-assay 100% zien voor PPC en PNC voor alle geteste varianten.

Bij het lage variantniveau (~1x LoD) varieerde de PPC voor kleine DNA-varianten van 83,3% tot 98,1% en de PPC voor RNA-fusies van 90,7% tot 100%. Voor varianten met een PPC < 95% lagen de gemiddelde VAF's (RET C634Y en RET D898_E901del) of ondersteunende aflezingen (NCOA4-RET en BCAN-NTRK1) onder de respectievelijke detectielimieten. Bij het lage variantniveau werd 100% PNC bereikt voor alle varianten.

Tabel 62 Kwantitatieve resultaten voor gerichte DNA-varianten

Variantniveau	Variant	Varianttype	Gemiddelde VAF	PPC (95%-BI)	PNC (95%-BI)
Laag (~1x LoD)	RET C634Y	MNV	0,028	83,3% (45/54) (71,3 – 91,0%)	100,0% (215/215) (98,2 – 100,0%)
	RET D898_E901del	DELETIE	0,048	87,0% (47/54) (75,6 – 93,6%)	100,0% (215/215) (98,2 – 100,0%)
	RET C618R	SNV	0,045	94,4% (51/54) (84,9 – 98,1%)	100,0% (215/215) (98,2 – 100,0%)
	RET M918T	SNV	0,042	96,2% (51/53) (87,2 – 99,0%)	100,0% (216/216) (98,3 – 100,0%)
	RET D631_ L633delinsE	DELETIE	0,056	98,1% (53/54) (90,2 – 99,7%)	100,0% (215/215) (98,2 – 100,0%)

Variantniveau	Variant	Varianttype	Gemiddelde VAF	PPC (95%-BI)	PNC (95%-BI)
Hoog (~3x LoD)	RET C634Y	MNV	0,095	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (192/192) (98,0 – 100,0%)
	RET D898_E901del	DELETIE	0,088	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (192/192) (98,0 – 100,0%)
	RET C618R	SNV	0,146	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (192/192) (98,0 – 100,0%)
	RET M918	SNV	0,078	100,0% (52/52) (93,1 – 100,0%)	100,0% (194/194) (98,1 – 100,0%)
	RET D631_ L633delinsE	DELETIE	0,161	100,0% (32/32) (89,3 – 100,0%)	100,0% (214/214) (98,2 – 100,0%)

Voor elke variant in het gedeelte Detectielimieten worden nucleotideveranderingen vermeld, behalve voor RET D631_L633delinsE, wat Chromosoom 10, Positie 43609940, Referentie ACGAGCT, Alternatief A is.

Tabel 63 Kwalitatieve resultaten voor gerichte RNA-fusies

Variantniveau	Fusie	Gemiddelde ondersteunende aflezingen	PPC (95%-BI)	PNC (95%-BI)
Laag	TPM3-NTRK1	20,2	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (270/270) (98,6 – 100,0%)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4% (51/54) (84,9 – 98,1%)	100,0% (324/324) (98,8 – 100,0%)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100% (324/324) (98,8 – 100,0%)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (270/270) (98,6 – 100,0%)
	ETV6-NTRK3 (FFPE-cellijn)	23,1	98,1% (53/54) (90,2 – 99,7%)	
	NCOA4-RET	13,3	90,7% (49/54) (80,1 – 96,0%)	100,0% (270/270) (98,6 – 100,0%)
	CCDC6-RET	18,7	98,1% (53/54) (90,2 – 99,7%)	100,0% (324/324) (98,8 – 100,0%)
Hoog	TPM3-NTRK1	57,1	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (216/216) (98,3 – 100,0%)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (270/270) (98,6 – 100,0%)
	ETV6-NTRK2	52	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (270/270) (98,6 – 100,0%)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (216/216) (98,3 – 100,0%)
	ETV6-NTRK3 (FFPE-cellijn)	28,3	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	
	NCOA4-RET	24,8	100,0% (54/54) (93,4 – 100,0%)	100,0% (216/216) (98,3 – 100,0%)
	CCDC6-RET	N.v.t.	Niet getest	100,0% (324/324) (98,8 – 100,0%)

Kwantitatieve analyse

Er werd analyse uitgevoerd op REML-variantiecomponenten (restricted maximum likelihood) om de totale variatie van de onderliggende continue variabele (VAF voor kleine DNA-varianten en ondersteunende aflezingen voor RNA-fusies) te evalueren en de componenten van de precisie [standaarddeviatie (SD),

variatiecoëfficiënt (CV)] te schatten voor elke bron van variatie [operators, instrumenten, dagen, reagenspartijen, resterend en totaal]. De resultaten worden gepresenteerd in Tabel 64 voor kleine DNA-varianten en in Tabel 65 voor RNA-fusies.

De variatie in VAF nam toe met het gemiddelde, zoals verwacht voor een binomiaal aandeel. De variatie bij ondersteunende nam toe met het gemiddeld zoals verwacht bij tellingsgegevens. De resterende component was de grootste bijdrager aan de totale variantie voor zowel kleine DNA-varianten als RNA-fusies op beide niveaus, wat de conclusie ondersteunt dat detectie van deze varianten door TSO Comprehensive (EU) robuust is voor wat betreft operators, partijen, instrumenten en dagen.

Tabel 64 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten voor gerichte kleine DNA-varianten

VAF-niveau	Variant	Variant-type	N geldige pog-ingen	Gemid-delde VAF	Oper-ator SD (%CV)	Instru-ment SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Rest-erend SD (%CV)	To-taal SD (%CV)
Laag (~1x LoD)	RET D898_E901del	DELETIE	54	0,048	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (8,7)	0,014 (30,0)	0,015 (31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (31,3)	0,014 (31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000 (0,0)	0,001 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (25,6)	0,011 (25,7)
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (3,3)	0,000 (0,0)	0,009 (30,7)	0,009 (30,9)
	RET D631_L633delinsE	DELETIE	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
Hoog (~3x LoD)	RET D898_E901del	DELETIE	54	0,088	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (1,4)	0,006 (7,0)	0,017 (19,2)	0,018 (20,5)
	RET C618R	SNV	54	0,146	0,003 (1,7)	0,000 (0,0)	0,020 (13,7)	0,002 (1,1)	0,018 (12,6)	0,027 (18,7)
	RET M918T	SNV	52	0,078	0,002 (3,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (9,1)	0,018 (23,1)	0,020 (25,0)
	RET C634Y	MNV	54	0,095	0,000 (0,0)	0,002 (2,5)	0,002 (2,1)	0,000 (0,0)	0,014 (15,0)	0,015 (15,3)
	RET D631_L633delinsE	DELETIE	52*	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

* Omvat 20 observaties met mislukte QC voor mediane exondekking maar die dekking hebben bij de RET-variantpositiewell boven de lagedieptegrenswaarde van 100 (gemiddelde diepte = 374).

Tabel 65 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten voor gerichte kleine RNA-fusies

Niveau ondersteunende aflezingen	Fusie	N geldige pogingen	Gemiddelde ondersteunende aflezingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
Laag	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,3 (11,5)	0,9 (4,7)	3,3 (16,4)	0,8 (4,1)	5,7 (28,2)	7,1 (35,2)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,4 (15,3)	1,4 (6,4)	1,8 (8,0)	0,0 (0,0)	6,0 (27,2)	7,3 (32,9)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,0 (0,0)	3,2 (15,7)	4,4 (21,5)	0,0 (0,0)	8,3 (40,8)	9,9 (48,7)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,3 (14,0)	2,4 (14,6)	2,2 (13,4)	0,0 (0,0)	4,7 (28,7)	6,1 (37,5)
	ETV6-NTRK3 (cellijn)	54	23,1	4,6 (19,7)	1,2 (5,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,7 (29,1)	8,2 (35,5)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,7 (12,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (12,6)	5,1 (38,3)	5,6 (42,2)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,0 (0,0)	1,1 (6,1)	5,4 (29,1)	0,0 (0,0)	6,2 (33,0)	8,3 (44,4)
Hoog	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,2 (19,6)	1,2 (2,1)	5,7 (9,9)	2,0 (3,5)	11,9 (20,8)	17,4 (30,5)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,2 (15,5)	0,8 (1,4)	5,6 (10,5)	2,9 (5,4)	11,3 (21,3)	15,4 (28,9)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,0 (0,0)	4,1 (7,8)	7,1 (13,6)	5,7 (11,0)	12,9 (24,9)	16,3 (31,4)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,2 (17,2)	0,4 (1,0)	6,4 (15,4)	0,0 (0,0)	10,7 (25,8)	14,4 (34,6)
	ETV6-NTRK3 (cellijn)	54	28,3	7,9 (28,0)	1,0 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	9,1 (32,0)	12,1 (42,6)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,1 (12,3)	0,0 (0,0)	5,9 (23,9)	0,0 (0,0)	6,8 (27,3)	9,5 (38,3)

Onderzoek 2

Intralaboratoriumprecisie werd geëvalueerd voor TMB en MSI. Er werden 5 NSCLC FFPE DNA-monsters voor TMB en 7 CRC FFPE-monsters voor MSI, waaronder zowel microsatelliet stabiel (MSS) als MSI-High, gebruikt om de precisie te evalueren op verschillende niveaus binnen het scorebereik. Alle monsters werden uitgevoerd in duplicaat door 3 operators, op 3 dagen, met 3 bibliotheekpreparaties voor 3 reagenspartijen met behulp van 3 NextSeq 550Dx-instrumenten die 54 observaties per niveau genereerden.

Kwalitatieve concordantie werd geëvalueerd voor MSI-status. De TSO Comprehensive (EU)-assay toonde 100% concordantie voor percentage positieve bepalingen en percentage negatieve bepalingen voor MSI-status. Voor TMB meldt de TSO Comprehensive (EU)-assay een TMB-score; kwalitatieve concordantie is niet van toepassing.

De totale variatie van TMB- en MSI-score, samen met de bijdrage per bron (instrumenten, operators, partijen, dagen en resterend), werd gekwantificeerd met behulp van een variantiecomponentenmodel bij verschillende scores. De standaarddeviatie (SD) en variatiecoëfficiënt (CV) worden gepresenteerd in Tabel 66 voor TMB en Tabel 67 voor MSI, per niveau. Sommige niveaus hadden minder dan 54 observaties als gevolg van ongeldige bibliotheken.

Tabel 66 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten TMB-score

Niveau	Gemiddelde TMB-score	N geldige pogingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0%)	0,06 (23%)	0,00 (0%)	0,08 (30%)	0,40 (146%)	0,41 (151%)
L2	8,4	53	0,00 (0%)	0,14 (2%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,71 (8%)	0,73 (9%)
L3	15,1	54	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,20 (1%)	0,00 (0%)	1,16 (8%)	1,18 (8%)
L4	20,3	53	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,06 (0%)	0,00 (0%)	0,56 (3%)	0,57 (3%)
L5	42,3	54	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,15 (0%)	0,00 (0%)	1,37 (3%)	1,38 (3%)

Tabel 67 Kwantitatieve SD- en CV-resultaten MSI-score

MSI-status	Niveau	Gemiddelde MSI-score (%)	N geldige pogingen	Operator SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Partij SD (%CV)	Dag SD (%CV)	Resterend SD (%CV)	Totaal SD (%CV)
MS-stabiel	L1	0,80	53	0,35 (43%)	0,00 (0%)	0,15 (18%)	0,00 (0%)	0,52 (66%)	0,64 (81%)
	L2	5,90	53	0,47 (8%)	0,00 (0%)	0,84 (14%)	0,00 (0%)	1,26 (21%)	1,58 (27%)
MSI-High	L3	48,68	53	0,19 (0%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	1,19 (2%)	2,48 (5%)	2,76 (6%)
	L4	56,85	54	1,66 (3%)	0,00 (0%)	1,92 (3%)	0,00 (0%)	3,07 (5%)	3,98 (7%)
	L5	72,62	54	0,00 (0%)	0,47 (1%)	0,34 (0%)	0,62 (1%)	1,28 (2%)	1,54 (2%)
	L6	75,29	54	0,00 (0%)	0,42 (1%)	0,09 (0%)	0,00 (0%)	1,46 (2%)	1,52 (2%)
	L7	78,38	54	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,45 (1%)	0,95 (1%)	1,06 (1%)

De variatie in TMB-scores heeft de neiging toe te nemen met het gemiddelde zoals verwacht op grond van de theoretische distributies van tellingsgegevens. De variatie in MSI-scores voor niveaus in de buurt van MSI-score = 50 is groter dan de variatie van MSI-scores dichter bij 0 of 100, overeenkomstig de variabiliteit van theoretische distributies van verhoudingsgegevens. De resterende component bleef de grootste bijdrager aan de totale variantie voor zowel MSI- als TMB-scores, wat de conclusie ondersteunt dat de scores robuust zijn voor operators, partijen, instrumenten en dagen.

C5- en C95-waardes rond de grenswaarde van 20,00% werden vastgesteld voor MSI aan de hand van een precisieprofiel (Tabel 68).

Tabel 68 C5-C95-intervallen voor MSI

Score	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

Aangezien MSI en TMB complexe biomarkers zijn, kan de analytische prestatie echter variëren van monster tot monster. Dat wil zeggen, TMB-variatie is niet alleen afhankelijk van de TMB-waarde maar ook van de samenstelling van varianten in het monster, zoals varianttype (SNV, Indel) en VAF-niveau (nabijheid tot inclusiegrenswaarde). Evenzo is de MSI-variatie niet alleen afhankelijk van de MSI-waarde maar ook van de samenstelling van de locaties in het monster, zoals het aantal locaties dat instabiel is en de mate van instabiliteit per locatie.

De impact van tumorcontent op TMB- en MSI-scores werd geëvalueerd. Bij de meeste monsters had een tumorcontent van ≥ 30% een verwaarloosbare impact op TMB-scores boven ongeveer 10 mutaties per megabase. TMB-scores bleven relatief onveranderd met toenemende tumorcontent. Bij MSI-High-monsters vertoonde de tumorcontent een positieve, lineaire correlatie met de MSI-score. MSI-High-monsters bleven gemiddeld MSI-H als de tumorcontent ≥ 30% was. Endometriale monsters gedroegen zich opvallend anders dan de andere weefseltypen en bleken een grotere hoeveelheid tumorcontent nodig te hebben om MSI-H te kunnen worden genoemd.

Nauwkeurigheid bij tumorprofilering

De detectie van varianten door TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van referentiemethoden. Kleine DNA-varianten en TMB werden vergeleken met een externe whole exome, next-generation sequencing (NGS)-methode. Genamplificaties werden vergeleken met dezelfde whole exome NGS-methode of gevalideerde Dual In-Situ Hybridization-(DISH-)methode voor HER2-amplificaties. MSI werd geëvalueerd tegen een gevalideerde MSI-PCR-test. RNA-splicevarianten werden vergeleken tegen een gevalideerde kwantitatieve PCR-methode (qPCR). ROS1- en ALK-fusies werden vergeleken tegen gevalideerde FISH-tests. Alle andere fusies werden vergeleken met een samengestelde methode, die bestaat uit een gevalideerde RNA whole exome NGS-test (RNGS1), een gericht NGS-panel (RNGS2) en ddPCR (droplet digital PCR).

Detectie van kleine DNA-varianten

De detectie van kleine DNA-varianten door de TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van WES (whole exome sequencing) waarbij WES wordt gebruikt bij gematchte tumor-normaal monsterparen voor het bepalen van kiemlijn- en somatische kleine varianten. De vergelijking tussen kleine varianten, die bestaan uit enkelvoudige nucleotidevarianten (SNV's), inserties en deleties werd gebaseerd op 124 monsters van 14 verschillende weefseltypen die geldig waren voor zowel TSO Comprehensive (EU) als WES. De TSO Comprehensive (EU)-assay kan multi-nucleotide-varianten (MNV's, 2-3bp) detecteren, wat fasering vereist; de WES-assay kan dit niet. TSO Comprehensive (EU) MNV's werden geëvalueerd als individuele SNV's tegen WES. Een samenvatting van concordantie op variantniveau, inclusief PPA (Positive Percent Agreement) en NPA (Negative Percent Agreement) voor alle variantbepalingen wordt weergegeven in Tabel 69.

Tabel 69 Samenvatting concordantie voor kleine variantbepalingen, geëvalueerd met kiemlijn- of somatische status

	WES Somatic bepaald	WES Germline bepaald	WES niet bepaald
TSO Comprehensive (EU) bepaald	382	33.163	426
TSO Comprehensive (EU) niet bepaald	69	61	70.000.481

	WES Somatic bepaald	WES Germline bepaald	WES niet bepaald
Totaal	451	33.224	70.000.907
Percentage overeenkomst	PPA: 85% (382/451), 95%-BI: [81% - 87%]	PPA: 99,8% (33.163/33.224) 95%-BI: [99,8% - 99,9%]	NPA: 99,999% (70.000.481/70.000.907) 95%-BI: [99,999% - 99,999%]

In totaal bepaalde TSO Comprehensive (EU) 426 somatische varianten die niet werden gedetecteerd met de WES-methode. 204 van deze varianten (48%) hadden variantallelfrequenties onder de drempelwaarde voor bepaling bij de WES-methode. Bij de resterende mogelijke fout-positieve varianten was er bewijs van de variantbepaling bij de WES-methode met lage ondersteuning. Bovendien hadden veel van de varianten een zeer laag WES-bewijsniveau in de gematchte normale monsters. Dit suggereert dat deze varianten in de tumor door WES zijn gemist vanwege tumor-in-normaal-verontreiniging.

SNV's, inserties en deleties werden ook individueel geëvalueerd op concordantie (Tabel 70, Tabel 71 en Tabel 72).

Tabel 70 Samenvatting van concordantie tussen TSO Comprehensive (EU) en WES voor kleine DNA-varianten (SNV's)

SNV's	WES Somatic bepaald	WES Germline bepaald	WES niet bepaald	Totaal
TSO Comprehensive (EU) bepaald	320	33.107	369	33.796
TSO Comprehensive (EU) niet bepaald	58	40	70.000.687	70.000.785
Totaal	378	33.147	70.001.056	70.034.581

Tabel 71 Samenvatting van concordantie tussen TSO Comprehensive (EU) en WES voor DNA-inserties

Inserties	WES Somatic bepaald	WES Germline bepaald	WES niet bepaald	Totaal
TSO Comprehensive (EU) bepaald	15	23	18	56
TSO Comprehensive (EU) niet bepaald	5	17	70.034.504	70.034.526
Totaal	20	40	70.034.522	70.034.582

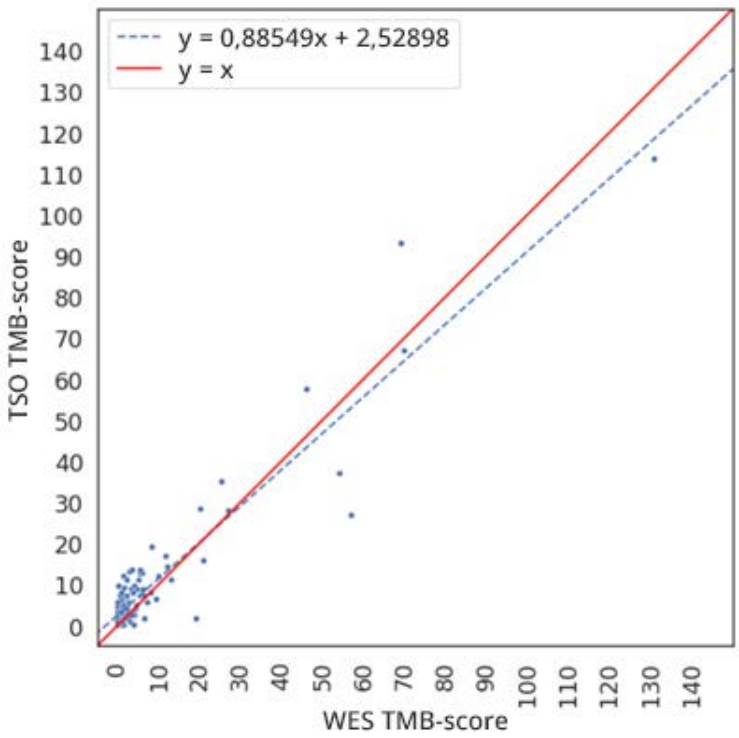
Tabel 72 Samenvatting van concordantie tussen TSO Comprehensive (EU) en WES voor DNA-deleties

Deleties	WES Somatic bepaald	WES Germline bepaald	WES niet bepaald	Totaal
TSO Comprehensive (EU) bepaald	47	33	39	119
TSO Comprehensive (EU) niet bepaald	6	4	70.034.453	70.034.463
Totaal	53	37	70.034.492	70.034.582

Detectie tumormutatiebelasting

De TMB-concordantie werd bepaald door het vergelijken van de TMB-scores (somatische mutaties/megabase) tussen de WES-methode en TSO Comprehensive (EU) voor 124 monsters met beschikbare gegevens van zowel TSO Comprehensive (EU) als WES. Lineaire regressieanalyse met WES als predictor had een y-snijpunt van 2,53, een curve van 0,89 en een Pearson's-correlatiecoëfficiënt van 0,94 (Afbeelding 5).

Afbeelding 5 Correlatie TMB-score tussen WES en TSO Comprehensive (EU)



Detectie van genamplificatie

De detectie van genamplificaties door de TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van dezelfde WES-assay die gebruikmaakt van ofwel tumor-normaal gematchte monsters ofwel monsters met alleen tumor. In totaal waren er 420 monsters, waarvan 183 met de orthogonale tumor/normaal methode en 237

met de methode voor alleen tumoren. De monsters waren afkomstig van 14 weefseltypen en bevatten amplificaties van 55 genen. TSO Comprehensive (EU) rapporteert genamplificaties van de MET- en ERBB2-genen. De nauwkeurigheid werd echter beoordeeld voor alle 55 genen. In Tabel 73 vindt u een overzicht van de genamplificatiebepalingen.

Tabel 73 Genamplificatiebepalingen

	WES positief	WES negatief
TSO Comprehensive (EU) positief	337	415
TSO Comprehensive (EU) negatief	28	24.000
Totaal	365	24.415
Percentage overeenkomst	PPA: 92% (337/365) 95%-BI:[89%, 95%]	NPA: 98,3% (24.000/24.415) 95%-BI:[98,1%, 98,5%]

ERBB2-(HER2-)amplificaties in maag- en borstweefsel werden gescheiden van andere genamplificaties geanalyseerd met een Dual In-Situ Hybridization-methode (DISH-methode). In totaal werden 116 borst- en maagmonsters getest, waarvan 64 eerder werden gekenmerkt als HER2-positief met IHC of FISH. Eén monster mislukte bij extractie, 3 monsters misten validiteit voor TSO Comprehensive (EU) en 3 monsters misten validiteit voor de DISH-assay. Van de 108 monsters hadden er 20 (18,5%) borderline scores (tussen 1,5 en 2,5) in de buurt van de DISH cutoff van 2,0. Concordantieresultaten inclusief PPA, NPA voor alle monsters en exclusief borderline HER2 DISH-gevallen worden getoond in Tabel 74.

Tabel 74 Een samenvatting van concordantie tussen TSO Comprehensive (EU) en HER2 DISH, inclusief voor HER2-genamplificatie

HER2-genamplificatie (borst- en maagweefsels)	HER2 DISH geamplificeerd	HER2 DISH niet-geamplificeerd
TSO Comprehensive (EU) positief	17 (inclusief 1 grensgeval)	13 (inclusief 1 grensgeval)
TSO Comprehensive (EU) negatief	10 (inclusief 6 grensgevallen)	68 (inclusief 12 grensgevallen)
Percentage overeenkomst inclusief grensgevallen	PPA: 63% (17/27) 95%-BI:[44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95%-BI:[74%, 90%]
Percentage overeenkomst buiten de grensgevallen	PPA: 80% (16/20) 95%-BI:[58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95%-BI:[72%, 90%]

Detectie microsatellietinstabiliteit

De detectie van microsatellietinstabiliteit door de TSO Comprehensive (EU)-assay werd vergeleken met de resultaten van een gevalideerde MSI-PCR-test die tumor-normaal gematchte monsters voor tests gebruikt. In totaal werden 195 monsters die voldeden aan de vereiste van ≥ 30% tumorinhoud die 14 weefseltypen vertegenwoordigden, vergeleken. MSI-PCR evalueert 5 locaties en heeft drie resultaten - MSS (geen instabiele

locaties), MSI-Low (1 instabiele locatie) en MSI-High (2 of meer instabiele locaties). TSO Comprehensive (EU) evalueert tot 130 microsatellietlocaties en classificeert monsters alleen als MSS of MSI-High (≥ 20% instabiele locaties). MSI-Low werden voor MSI-PCR gegroepeerd bij de MSS-resultaten. Concordantieanalyse wordt getoond in Tabel 75.

Tabel 75 Samenvatting van concordantieanalyse tussen TSO Comprehensive (EU) en MSI-PCR voor DNA-microsatellietinstabiliteit

MSI-instabiliteit	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSS
TSO Comprehensive (EU) instabiel (MSI-High)	40	2	0
TSO Comprehensive (EU) stabiel (MSI)	3	0	150
Totaal	43	2	150
Percentage overeenkomst	PPA: 93% (40/43) 95%-BI: [81%, 98%]	NPA:99% (150/152) 95%-BI: [95%, >99%]	

Detectie van RNA-splicevarianten

De nauwkeurigheid voor detectie van splicevarianten werd berekend door de TSO Comprehensive (EU)-resultaten te vergelijken met qPCR-assays voor EGFRvIII en Met Exon 14del, inclusief één bekend positief RNA voor elk van de splicevarianten. Er werd een concordantieanalyse uitgevoerd op in totaal 230 unieke FFPE RNA-monsters van 14 weefseltypen met beschikbare gegevens van zowel TSO Comprehensive (EU) als de referentiemethode. Alle monsters werden getest op MET Exon 14del, terwijl EGFRvIII alleen in hersenweefsel werd getest. 3 monsters die door qPCR maar niet door TSO Comprehensive (EU) positief werden genoemd voor MET Exon 14 del hadden een gemiddelde Ct > 37 en lagen onder het LoD-niveau van TSO Comprehensive (EU).

Tabel 76 Samenvatting van concordantieanalyse tussen TSO Comprehensive (EU) en qPCR-assay voor RNA-splicevarianten

RNA-splicevarianten	qPCR positief	qPCR negatief
TSO Comprehensive (EU) positief (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) negatief (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) positief (Met Exon 14Del)	1	0
TSO Comprehensive (EU) negatief (Met Exon 14Del)	3	217
Totaal	7	230
Percentage overeenkomst	PPA: 57% (4/7) 95%-BI:[25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95%-BI: [98%, 100%)

Detectie RNA-fusie

Vergelijking met een samengestelde methode

TSO Comprehensive (EU)-fusies werden vergeleken met een samengestelde methode die bestaat uit RNA whole exome sequencing met behulp van een NGS-panel (RNGS1), een gericht NGS-fusiepanel (RNGS2) en ddPCR (droplet digital PCR).

De RNGS1-methode overlapt met alle genen waarvoor TSO Comprehensive (EU) fusies kan detecteren. De detectielimiet van de RNGS1-methode was echter 4x tot 8x die van TSO Comprehensive (EU), gebaseerd op het aantal ondersteunende aflezingen dat werd waargenomen in de overlappende fusiebepalingen. Daarom werd een samengestelde methode van twee aanvullende methoden met grotere gevoeligheid maar minder breedte voor fusies gebruikt in combinatie met de WES-methode (RNGS1).

In totaal werden er 255 unieke RNA-monsters, die 14 weefseltypen vertegenwoordigen en voldoen aan de TSO Comprehensive (EU)-metrieken, getest met RNGS1. Twee monsters waren ongeldig voor de kwaliteitscontrole van RNGS1-monsters en werden uitgesloten van aanvullende analyse. Van de 82 fusies die werden bepaald met TSO Comprehensive (EU) werden er 4 uitgesloten van evaluatie als gevolg van fouten in de kwaliteitscontrole van RNGS1-monsters; ook konden 7 aanvullende fusies niet worden bepaald door de afwezigheid van targets in het RNGS1-panel. Van de resterende 71 fusies die werden bepaald met TSO Comprehensive (EU) werden 9 fusies bevestigd met RNGS1. RNGS1 bepaalde 4 fusies die niet werden bepaald met TSO Comprehensive (EU).

Van de 62 fusies die positief waren in TSO Comprehensive (EU) en niet werden gedetecteerd door RNGS1, overlapten er 13 met en werden bevestigd door RNGS2. Eén fusie werd bepaald met RNGS2 maar niet met TSO Comprehensive (EU).

Vervolgens werd ddPCR (droplet digital PCR) gebruikt voor fusies die door TSO Comprehensive (EU) werden bepaald, maar niet werden bepaald of niet te bepalen waren met RNGS1 en niet te evalueren waren met RNGS2 (49). Aanvullend werd ddPCR gebruikt voor het opnieuw evalueren van 2 van de 4 fout-negatieve fusies voor TSO Comprehensive (EU) met RNGS1 en 2 van 9 concordante fusies voor TSO Comprehensive (EU) en RNGS1. Er werden vijf fusie-negatieve monsters opgenomen bij het testen van elk positief fusiemonster om de specificiteit te waarborgen. Achttien fusies werden niet getest met ddPCR omdat er geen primers/probes ontworpen konden worden, vanwege meerdere genpartners voor de fusie of vanwege onvoldoende resterend FFPE-materiaal. Voor ddPCR zijn primers en probes ontworpen tegen de waargenomen breekpunten in de TSO Comprehensive (EU)-assay.

In totaal werden 52 fusies gedetecteerd door ddPCR, waarvan 41 werden bepaald door TSO Comprehensive (EU) maar niet werden bepaald of te bepalen waren met RNGS1. Negen fusies werden bepaald met ddPCR maar waren negatief met TSO Comprehensive (EU) of RNGS1. Twee ddPCR-positieve fusies bevestigden de 2 concordante fusies voor TSO Comprehensive (EU) en RNGS1. Er werd geen fusie gedetecteerd met ddPCR voor de twee opnieuw met RNGS1 geëvalueerde fout-negatieven met TSO Comprehensive (EU); deze werden echter geteld als fout-negatief op basis van de vergelijking met RNGS1.

De concordantieresultaten van de samengestelde methode (RNGS1, RNGS2 en ddPCR) voor fusies worden weergegeven in Tabel 77.

De 63 fusies die overeenstemden met de samengestelde methode vertegenwoordigden 43 genen in het TSO Comprehensive (EU)-panel. Fusies komen echter alleen in aanmerking voor rapportage als het gaat om de 23 genen die in *Genenpanel van de TSO Comprehensive (EU)-assay* op pagina 2 worden vermeld.

Tabel 77 Kruistabel Resultaten van TSO Comprehensive (EU) ten opzichte van samengestelde methode voor RNA-fusies (253 monsters)

Fusies	Samengestelde methode - positief	Samengestelde methode - negatief
TSO Comprehensive (EU) positief	63[1]	18
TSO Comprehensive (EU) negatief	14[2]	13.821
Totaal	77	13.839
Percentage overeenkomst	PPA: 82% (63/77) 95%-BI: [72%, 89%]	NPA: 99,9% (13821/13839) 95%-BI: [99,8%, 99,9%]

[1] 63 correct-positieven TSO Comprehensive (EU) = 9 positieven concordant met RNGS1 + 13 positief concordant met RNGS2 + 41 positief concordant met ddPCR
[2] 14 fout-negatieven TSO Comprehensive (EU) = 4 negatieven niet concordant met RNGS1 + 1 negatief niet concordant met RNGS2 + 9 negatief niet concordant met ddPCR

Vergelijking met FISH-methode voor ROS1- en ALK-fusies

25 NSCLC-monsters werden getest met FISH op zowel ROS1- als ALK-fusies en 5 aanvullende NSCLC-monsters werden getest voor ROS1-fusie. Bij acht monsters mislukte FISH voor ROS1 als gevolg van inadequaat weefsel. Twee ROS1- en één ALK-fusie werden gedetecteerd door zowel TSO Comprehensive (EU) als FISH. Er werden geen discordante resultaten waargenomen.

ALK+ROS1	FISH - positief	FISH - negatief
TSO Comprehensive (EU) positief	3	0
TSO Comprehensive (EU) negatief	0	44
Totaal	3	44
Percentage overeenkomst	PPA: 100% (3/3) 95%-BI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95%-BI: [92%, 100%]

Monstervaliditeit

Monstervaliditeit (eerste poging) werd gemeten voor 181 unieke RNA- en 272 unieke DNA-monsters uit FFPE-blokken met leeftijd ≤ 5 jaar. Deze monsters werden geselecteerd op basis van weefseltype en beschikbaar materiaal; validiteit van de test was onbekend. De kwaliteitscontrolemetriek van de bibliotheek moet voldoen

om het varianttype als geldig te beschouwen. De monstervaliditeit werd apart geëvalueerd voor elk van de typen varianten (kleine DNA-varianten / TMB, MSI, genamplificaties, fusies / splicevarianten) en wordt getoond in Tabel 78.

Tabel 78 Monstervaliditeit

Varianttype	Monstervaliditeit
Fusies/splicevarianten (RNA)	76%
Kleine DNA-varianten / TMB	75%
MSI	72%
Genamplificatie	94%

Samenvatting van analytische validatie

Gebaseerd op gegevens voor detectielimiet, precisie, reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid is TSO Comprehensive (EU) analytisch gevalideerd voor het volgende:

- Kleine DNA-varianten – SNV's, MNV's, inserties en deleties
- TMB
- MSI
- MET- en ERBB2- (HER2-) genamplificaties (raadpleeg *Genenpanel van de TSO Comprehensive (EU)-assay* op pagina 2).
- 23 genen waarvoor fusies kunnen worden gedetecteerd (raadpleeg *Genenpanel van de TSO Comprehensive (EU)-assay* op pagina 2).
- EGFR- en MET-splicevarianten (raadpleeg *Genenpanel van de TSO Comprehensive (EU)-assay* op pagina 2).

Klinische prestaties

Om de TSO Comprehensive (EU)-assay te valideren als begeleidende diagnostiek (CDx) voor de selectie van patiënten voor behandeling met VITRAKVI® (larotrectinib; Bayer AG), zijn er monsters van patiënten die deelnamen aan de klinische onderzoeken met larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; gezamenlijk aangeduid als de larotrectinib-onderzoeksmonsters) met een datumgrens van 15 JUL 2019, aangevuld met commercieel verkregen FFPE-weefselmonsters, getest ter ondersteuning van een nauwkeurigheidsonderzoek voor de TSO Comprehensive (EU)-assay en een klinisch overbruggingsonderzoek.

NCT02122913 was een multicenter, open-label, fase 1, dosisescalatieonderzoek bij volwassen patiënten met gevorderde solide tumoren (voor alle aanmeldingen) die niet zijn geselecteerd voor NTRK-fusie-positieve kanker. Na het dosisescalatiegedeelte van het onderzoek werd een dosisverhoging gestart voor patiënten met gedocumenteerde kanker positief voor NTRK-fusie en voor patiënten van wie de onderzoeker dacht dat ze baat zouden kunnen hebben bij een zeer selectieve TRK-remmer. NAVIGATE NCT02576431 is een lopend, multicenter, open-label, fase 2-basket-studie bij patiënten van 12 jaar en ouder met terugkerende, gevorderde

solide tumoren met een gedocumenteerde NTRK-fusie zoals beoordeeld door een extern laboratorium. SCOUT NCT02637687 is een lopend, multicenter, open-label, fase 1/2-onderzoek bij pediatrische patiënten van de geboorte tot 21 jaar met gevorderde solide of primaire tumoren van het centrale zenuwstelsel (CNS).

Van de patiënten die positief zijn voor NTRK-fusie en die opgenomen zijn in het TSO Comprehensive (EU)-assayonderzoek, vormden 164 de uitgebreide primaire werkzaamheidsset voor larotrectinib (ePAS4).

Nauwkeurigheidsonderzoek voor detectie NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusie

De nauwkeurigheid van de TSO Comprehensive (EU)-assay voor het detecteren van NTRK-fusies (NTRK1, NTRK2 of NTRK3) bij patiënten met solide tumoren werd aangetoond door de concordantie van de NTRK-fusieresultaten tussen de TSO Comprehensive (EU)-assay en een gevalideerde orthogonale methode op basis van next-generation sequencing (NGS) te beoordelen.

Er werd een retrospectief, niet-interventioneel onderzoek uitgevoerd. Larotrectinib-onderzoeksmonsters en aanvullende monsters werden getest met de TSO Comprehensive (EU)-assay op 1 externe locatie en met een orthogonale methode in een centraal laboratorium. Nauwkeurigheid van de TSO Comprehensive (EU)-assay NTRK-fusiebepalingen werd geschat ten opzichte van de orthogonale methode; positieve procentuele overeenstemming (PPA), negatieve procentuele overeenstemming (NPA) en de bijbehorende tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI's) werden berekend.

Er werden 516 monsters getest met de TSO Comprehensive (EU)-assay en/of de orthogonale methode. Hiervan werden 499 getest met beide methoden. Zeventien van de 516 monsters werden niet getest met een van de assays vanwege een mislukte extractie, onbekende reden (voor de orthogonale methode) of protocolafwijking. Van de 499 monsters die met beide methoden werden getest, waren 170 (34,1%) larotrectinib-onderzoeksmonsters en 329 (65,9%) aanvullende monsters.

Een kruistabel van de resultaten voor de 499 monsters staat in tabel 1. Van de 499 monsters hadden 85 monsters ongeldige analyseresultaten van de TSO Comprehensive (EU); van deze 85 hadden 53 ook ongeldige resultaten van de orthogonale methode. 7 extra monsters hadden ongeldige resultaten voor de orthogonale methode. Daarom hadden 407 van de 499 monsters volgens beide methoden geldige resultaten.

Tabel 79 NTRK-nauwkeurigheidsonderzoek: kruistabel van resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay versus resultaten van de orthogonale methode voor het detecteren van NTRK-fusies

	Resultaten orthogonale methode			
TSO Comprehensive (EU)-assayresultaat	**NTRK-fusie - positief**	**NTRK-fusie - negatief**	**Ongeldig**	**Totaal**
NTRK-fusie - positief	114	16	1	131
NTRK-fusie - negatief	4	273	6	283
Ongeldig*	4	28	53	85
Totaal	122	317	60	499

* Ongeldige resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay komen van de monster- en runniveaus.

De overeenkomstanalyses, exclusief en inclusief ongeldige TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten, staan in tabel 2. Exclusief ongeldige TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten was de PPA 96,6% (114/118; 95%-BI: 91,5%-99,1%) en de NPA 94,5% (273/289; 95%-BI: 91,2%-96,8%).

Tabel 80 NTRK-nauwkeurigheidsonderzoek: PPA en NPA van de TSO Comprehensive (EU)-assay in vergelijking met de resultaten van de orthogonale methode voor het detecteren van NTRK-fusies

	Exclusief ongeldige resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay		Inclusief ongeldige resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay	
Meting overeenkomst	**Overeenkomst, % (n/N)**	**95%-BI***	**Overeenkomst, % (n/N)**	**95%-BI***
PPA	96,6% (114/118)	91,5%–99,1%	93,4% (114/122)	87,5%–97,1%
NPA	94,5% (273/289)	91,2%–96,8%	86,1% (273/317)	81,8%–89,7%

* 95%-BI op basis van de (exacte) Clopper-Pearson-methode.

Klinisch overbruggingsonderzoek voor detectie NTRK1-, NTRK2-, NTRK3-fusie

De klinische validiteit van de TSO Comprehensive (EU)-assay voor het detecteren van NTRK1-, NTRK2- of NTRK3-fusies bij patiënten met solide tumoren die baat kunnen hebben bij een behandeling met larotrectinib, werd aangetoond in een klinisch overbruggingsonderzoek. De studie werd uitgevoerd om de klinische effectiviteit te beoordelen van de TSO Comprehensive (EU)-assay om patiënten met een positieve reactie op NTRK1-, NTRK2- of NTRK3-fusie te identificeren voor behandeling met larotrectinib, en om de concordantie tussen de TSO Comprehensive (EU)-assay en lokale testmethoden (LT) (gebruikt om de NTRK-fusiestatus te bepalen voor de klinische onderzoeken met larotrectinib) te beoordelen.

LT-methoden omvatten NGS, fluorescerende in situ hybridisatie (FISH), polymerasekettingreactie (PCR) en Nanostring-assays. NTRK-fusies (ETV6 NTRK3) werden afgeleid voor patiënten met infantiel fibrosarcoom die een gedocumenteerde, door FISH geïdentificeerde ETV6-translocatie hadden. De meerderheid van de 235 patiënten in het larotrectinib-onderzoek met een bekende NTRK-fusiestatus is getest met NGS-methoden.

De onderzoeken NAVIGATE NCT02576431 en SCOUT NCT02637687 nemen nog deelnemers aan. Op de einddatum van de gegevens 15 JUL 2019 namen 279 patiënten deel. Van de 279 patiënten toonden 208 een positieve NTRK-fusie. Van de 208 positieve patiënten vormden 164 de larotrectinib ePAS4.

Het primaire eindpunt voor de larotrectinib-analyse van de werkzaamheid was het totale responspercentage (ORR) volgens de beoordeling van de onafhankelijke beoordelingscommissie (IRC) in een gepoolde gegevensset van de 3 klinische onderzoeken. De ORR werd beoordeeld op basis van het percentage patiënten met de beste algehele respons van bevestigde volledige respons of bevestigde gedeeltelijke respons op basis van de RECIST-criteria, versie 1.1. De ORR in de larotrectinib ePAS4 was 72,6% (95%-BI [65,1%, 79,2%]) en omvatte patiënten met 16 verschillende tumortypes.

Monsterberekening

De monsterset omvatte een representatie van een breed scala aan tumortypes en monsters van pediatrische en volwassen patiënten.

Op 15 JUL 2019 waren er 279 patiënten ingeschreven in de larotrectinib-onderzoeken. Hiervan hadden 235 patiënten een bekende NTRK-fusiestatus zoals bepaald met een LT-methode: 208 waren positief en 27 waren negatief. Voor 44 patiënten was de NTRK-fusiestatus onbekend, aangezien testen niet vereist was voor de patiënt om in aanmerking te komen voor de dosisescalatiefasen van de onderzoeken NCT02122913 en SCOUT NCT02637687. Voor het klinische overbruggingsonderzoek van de TSO Comprehensive (EU)-assay kwamen monsters van larotrectinib-onderzoekspatiënten met een bekende NTRK-fusiestatus (208 positieve patiënten en 27 negatieve patiënten) die ingeschreven waren op 15 JUL 2019 en de aanvullende monsters die negatief waren bevonden voor NTRK-fusie volgens representatieve LT-methoden in aanmerking.

Van de 208 positieve larotrectinib-onderzoeksmonsters hadden 154 een monster beschikbaar voor het testen met de TSO Comprehensive (EU)-assay. Hiervan toonden 138 geldige resultaten. Vijftien (15) monsters waren ongeldig vanwege mislukte kwaliteitsmetingen van de monstersequencing en 1 monster werd niet getest vanwege een protocolafwijking. Van de 27 negatieve larotrectinib-onderzoeksmonsters hadden 24 een monster beschikbaar voor het testen. Hiervan toonden 22 geldige resultaten voor de TSO Comprehensive (EU)-assay. Twee monsters waren ongeldig vanwege mislukte kwaliteitsstatistieken van de monstersequencing.

Aanvullende monsters werden gescreend met behulp van een van de twee representatieve LT-methoden. Er werden meer dan 350 monsters verkregen en onderzocht op tumorinhoud. Van de aanvullende monsters die aan de vereisten voor monsters voldeden, werden er 266 met succes geëxtraheerd en bevestigd als NTRK-fusie-negatief met behulp van een representatieve LT-methode. Hiervan waren er 260 beschikbaar voor het testen met de TSO Comprehensive (EU)-assay, waarvan 222 geldige resultaten hadden. 38 monsters waren ongeldig vanwege mislukte metingen van de monstersequencing (n = 25) of mislukte sequencing van de run (n = 13). De totale set die negatief was voor NTRK-fusie bestond uit 222 aanvullende monsters en 22 larotrectinib-onderzoeksmonsters.

Resultaten concordantie

Overeenkomst van TSO Comprehensive (EU)-resultaten ten opzichte van resultaten van LT-methoden, met en zonder ongeldige TSO Comprehensive (EU)-resultaten, worden weergegeven in Tabel 81.

Tabel 81 Klinisch NTRK-overbruggingsonderzoek: concordantie tussen de TSO Comprehensive (EU)-assay en LT-methoden voor de detectie van NTRK-fusies

	Exclusief ongeldige resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay		Inclusief ongeldige resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay	
Meting overeenkomst	**% Overeenkomst (n/N)**	**95%-BI***	**% Overeenkomst (n/N)**	**95%-BI***
PPA	89,1% (123/138)	82,7%-93,8%	80,4% (123/153)	73,2%-86,4%
NPA	96,3% (235/244)	93,1%-98,3%	82,7% (235/284)	77,8%-87,0%
OPA	93,7% (358/382)	90,8%-95,9%	81,9% (358/437)	78,0%-85,4%

* Het tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsinterval (BI) werd berekend met behulp van de (exacte) Clopper-Pearson-methode

Gevoeligheidsanalyse tegen de ontbrekende TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten toonde de robuustheid van de overeenkomstanalyse aan. Ontbrekende TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten voor de patiënten die positief zijn voor NTRK-fusie volgens LT (n = 70) werden met behulp van een logistisch regressiemodel geïmputeerd. Geschatte overeenkomst, inclusief de geïmputeerde waarden, worden in Tabel 82 weergegeven.

Tabel 82 Klinisch NTRK-overbruggingsonderzoek: concordantie tussen de TSO Comprehensive (EU)-assay en LT-methoden voor de detectie van NTRK-fusies inclusief geïmputeerde waarden voor LT-positieve patiënten met ontbrekende TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten

Meting overeenkomst	% overeenkomst	95%-BI*
PPA	85,2%	78,6%-91,7%
NPA	96,3%	93,9%-98,7%
OPA	91,2%	87,9%-94,5%

Ontbrekende TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten voor fusie-negatieve patiënten volgens LT werden niet geïmputeerd.
* De tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI's) worden berekend op basis van de Boot-methode voor meervoudige imputatie. De Boot-methode voor meervoudige imputatie is een bootstrap-stap die gebaseerd is op de meervoudige imputatie (Schomaker en Heumann 2018).

Overeenkomsten tussen de TSO Comprehensive (EU)-assay en LT's per methodetype (zoals RNA NGS, FISH) worden weergegeven in Tabel 83.

Tabel 83 Klinisch NTRK-overbruggingsonderzoek: concordantie tussen de TSO Comprehensive (EU)-assay en LT-methoden voor de detectie van NTRK-fusies per methodetype

LT-methodetype	Mate van overeenkomst	% Overeenkomst (n/N)	95%-BI[1]
DNA NGS	PPA	84,2% (32/38)	68,7%-94,0%
	NPA	88,9% (16/18)	65,3%-98,6%
	OPA	85,7% (48/56)	73,8%-93,6%
RNA NGS[2]	PPA	91,5% (75/82)	83,2%-96,5%
	NPA	96,9% (218/225)	93,7%-98,7%
	OPA	95,4% (293/307)	92,5%-97,5%
FISH	PPA	80,0% (8/10)	44,4%-97,5%
	NPA	Niet berekend (1/1)	Niet berekend
	OPA	81,8% (9/11)	48,2%-97,7%
PCR	PPA	100,0% (8/8)	63,1%-100,0%
	NPA	Niet berekend (0/0)	Niet berekend
	OPA	100,0% (8/8)	63,1%-100,0%

[1] Het tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsinterval (BI) werd berekend met behulp van de (exacte) Clopper-Pearson-methode
[2] Inclusief NGS-methodes waarbij uitsluitend RNA en zowel DNA als RNA wordt gebruikt.
Niet berekend: voor subgroepen met monsteraantal < 5 werden geen overeenkomststatistieken berekend.

Van de 437 monsters die werden getest met de TSO Comprehensive (EU)-assay, hadden er 24 discordante resultaten met de LT's: 15 waren positief volgens de LT's en negatief volgens de TSO Comprehensive (EU)-assay en 9 waren negatief volgens de LT's en positief volgens de TSO Comprehensive (EU)-assay. Van de 24 monsters met discordante resultaten werden er 8 getest met een DNA NGS LT-methode, 14 met een RNA NGS LT-methode en 2 met FISH.

Een gevalideerde onafhankelijke NGS-methode bevestigde TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten in 14 van de 24 monsters met discordante resultaten. Voor de overige 10 monsters waren de resultaten van de TSO Comprehensive (EU)-assay discordant met zowel de LT- als de onafhankelijke NGS-methode.

Resultaten klinische werkzaamheid

Binnen de ePAS4 was de werkzaamheid van larotrectinib in de TSO Comprehensive (EU)-positieve, LT-positieve populatie (97 patiënten, ORR = 78,4%, 95%-BI [68,8%, 86,1%]) vergelijkbaar met de werkzaamheid van larotrectinib in de totale ePAS4-populatie (164 patiënten, ORR = 72,6%, 95%-BI [65,1%, 79,2%]) (Tabel 84). Van de 97 TSO Comprehensive (EU)-positieve patiënten in ePAS4 hadden 28 (28,9%) patiënten een volledige respons/chirurgisch volledige respons bereikt en 48 (49,5%) patiënten een gedeeltelijke respons.

Van de 13 TSO Comprehensive (EU)-negatieve, LT-positieve populatie, vertoonde 1 (7,7%) volledige respons en 2 (15,4%) gedeeltelijke respons bij behandeling met larotrectinib.

Tabel 84 Klinisch NTRK-overbruggingsonderzoek: ORR voor LT-positieve patiënten door LT- en TSO Comprehensive (EU)-resultaten in ePAS4

		LT-fusie - positief N = 164	**TSO Comprehensive (EU)-positief en LT-positief N = 97**	**TSO Comprehensive (EU)-negatief en LT-positief N = 13**
Beste algehele respons, n (%)	Volledige respons	31 (18,9%)	22 (22,7%)	1 (7,7%)
	Chirurgisch volledige respons	8 (4,9%)	6 (6,2%)	0
	Gedeeltelijke respons	80 (48,8%)	48 (49,5%)	2 (15,4%)
	Stabiel ziektebeeld	25 (15,2%)	13 (13,4%)	4 (30,8%)
	Progressief ziektebeeld	13 (7,9%)	6 (6,2%)	5 (38,5%)
	Niet te beoordelen	7 (4,3%)	2 (2,1%)	1 (7,7%)

		LT-fusie - positief N = 164	TSO Comprehensive (EU)-positief en LT-positief N = 97	TSO Comprehensive (EU)-negatief en LT-positief N = 13
Algehele respons	Aantal patiënten, n	164	97	13
	Aantal patiënten met CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95%-BI*)	72,6% (65,1%, 79,2%)	78,4% (68,8%, 86,1%)	23,1% (5,0%, 53,8%)

Afkortingen: CR = Volledige respons, PR = Gedeeltelijke respons, sCR = Chirurgisch volledige respons.
* Het tweezijdige 95% betrouwbaarheidsinterval werd berekend met behulp van de (exacte) Clopper-Pearson-methode.
Bij 54 patiënten ontbreken de TSO Comprehensive (EU)-assayresultaten.

De gegevens van dit onderzoek ondersteunen de veiligheid en effectiviteit van de TSO Comprehensive (EU)-assay wanneer deze worden gebruikt om patiënten met solide tumoren met NTRK-fusies te identificeren die mogelijk in aanmerking komen voor behandeling met larotrectinib.

Referenties

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org.

Revisiegeschiedenis

Document	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200007789 v05	September 2022	Bijgewerkte reproduceerbaarheidstabellen voor onderzoek 2.
Documentnr. 200007789 v04	Juni 2022	Onderdeelnummers TSO Comprehensive-analysemodule v2.3.5 toegevoegd. Onderdeelnummers TSO Comprehensive-analysemodule v2.3.3 verwijderd. Terminologie in gedeelte Blancolimiet bijgewerkt.

Document	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200007789 v03	April 2022	Informatie over prestatiekenmerken met betrekking tot NTRK-fusies toegevoegd. Toegevoegde VOOR UITSLUITEND VOOR EXPORT markering. Beoogde gebruiksverklaring bijgewerkt om de NTRK1-3 CDx-claim toe te voegen. Informatie over productcomponenten uitgebreid om onderdeelnummers van softwarecomponenten op te nemen.
Documentnr. 200007789 v02	Februari 2022	Fout in tabelverwijzing gecorrigeerd. Beperking toegevoegd met betrekking tot kiemlijn- en somatische varianten. Verduidelijking van de tekst rond detectie van genamplificatie.
Documentnr. 200007789 v01	December 2021	Beperkingen van de procedure bijgewerkt. De specificaties van de magnetische standaard en thermocycler verduidelijkt in de lijst met apparatuur en materialen.
Documentnr. 200007789 v00	November 2021	Eerste uitgave.

Octrooien en handelsmerken

Dit document en de inhoud ervan zijn eigendom van Illumina, Inc. en haar dochterondernemingen ('Illumina'), en zijn alleen bedoeld voor contractueel gebruik door haar klanten in verband met het gebruik van de hierin beschreven producten en voor geen enkel ander doel. Dit document en de inhoud ervan mogen niet worden gebruikt of gedistribueerd voor welk ander doel dan ook en/of op een andere manier worden gecommuniceerd, geopenbaard of gereproduceerd zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van Illumina. Illumina geeft door middel van dit document geen licenties onder haar patent, handelsmerk, auteursrecht of gewoonterechten noch soortgelijke rechten van derden door.

De instructies in dit document moeten strikt en uitdrukkelijk worden opgevolgd door gekwalificeerd en voldoende opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van de hierin beschreven producten te waarborgen. Alle inhoud van dit document moet volledig worden gelezen en begrepen voordat dergelijke producten worden gebruikt.

HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN (INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN) EN SCHADE AAN ANDERE EIGENDOMMEN. BIJ HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT VERVALLEN ALLE GARANTIES DIE VAN TOEPASSING ZIJN OP HET PRODUCT.

ILLUMINA IS OP GEEN ENKELE MANIER AANSPRAKELIJK VOOR GEVOLGEN VAN EEN ONJUIST GEBRUIK VAN DE PRODUCTEN DIE HIERIN WORDEN BESCHREVEN (INCLUSIEF DELEN DAARVAN OF SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn het eigendom van Illumina, Inc. of hun respectievelijke eigenaren. Ga naar www.illumina.com/company/legal.html voor meer informatie over specifieke handelsmerken.

Contactgegevens

Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Californië 92122 VS
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (buiten Noord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

IVD

EC REP

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

Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die worden weergegeven op de verpakkingen en labels van de producten het symbooloverzicht voor uw kit op support.illumina.com op het tabblad *Documentation*.

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT