



# **Plasma-SeqSensei™**














Solid Cancer IVD Kit

Gebrauchsanweisung

Dezember 2023

ZR150537.R3

IN VITRO TEST/Nur zur Anwendung in der In-vitro-Diagnostik.

<b>Bedeutung der Symbole</b>			
	Hersteller		Verwendbar bis
	Bestellnummer		Chargen-bezeichnung
	Inhalt ist ausreichend für <n> Tests		Vorsicht
	Temperaturbegrenzung		Gebrauchsanweisung beachten
	In-vitro-Diagnostik		Nicht wiederverwenden
	Vor Licht schützen		Vor Nässe schützen
	Grenze für Luftfeuchtigkeit		

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Beabsichtigter Verwendungszweck</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einführung</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Testprinzip</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Abgedeckte Regionen</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Interpretation der Variantenergebnisse</b>	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Einschränkungen</b>	<b>10</b>
<b>7</b>	<b>Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte</b>	<b>11</b>
7.1	Mitgelieferte Materialien	12
7.2	Nicht mitgelieferte Materialien	14
7.3	Verbrauchsmaterialien	15
7.4	Geräte	16
<b>8</b>	<b>Lagerung und Handhabung</b>	<b>18</b>
8.1	Transportbedingungen	18
8.2	Generelle Vorsichtsmaßnahmen für die Handhabung	18
8.3	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	19
8.3.1	Besondere Maßnahmen	19
8.3.2	Handhabung und Lagerung	19
8.3.3	Vorsichtsmaßnahmen für die Reagenzienhandhabung	20
8.3.4	Sicherheit und Kontaminationsvorbeugung	21
<b>9</b>	<b>Workflow</b>	<b>23</b>
9.1	UID-PCR (Multiplex-PCR)	24
9.2	UID-PCR-Aufreinigung	30
9.3	Index-PCR	34
9.4	Index-PCR-Aufreinigung	39
9.5	Bibliotheks-Qualitätskontrolle (Bioanalyzer)	43
9.6	Sequenzierung auf dem Illumina NextSeq™ 500/550	48
<b>10</b>	<b>Technische Unterstützung</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>Leistungsmerkmale</b>	<b>54</b>
11.1	Analytische Sensitivität	54
11.2	Analytische Spezifität	54
11.3	Präzision/Wiederholbarkeit	54
11.4	Messbereich/Linearität	55
11.5	Störsubstanzen	55
11.6	Klinische Leistungen und Eigenschaften	55
11.7	Einschränkungen	56
<b>12</b>	<b>Glossar und Begriffe</b>	<b>57</b>
<b>13</b>	<b>Literatur</b>	<b>59</b>
<b>14</b>	<b>Urheber- und Markenrechte</b>	<b>61</b>
<b>15</b>	<b>Revisionsverlauf</b>	<b>62</b>

### 1 Beabsichtigter Verwendungszweck

Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit ist ein quantitativer Next-Generation-Sequenzierungs(Next-Generation Sequencing, NGS)-Assay für den Nachweis und die Identifikation von Mutationen in den Zielgenen BRAF, EGFR, KRAS, NRAS und PIK3CA in humaner zirkulierender zellfreier DNA (cfDNA), die aus dem Blutplasma von Krebspatienten isoliert wird. Er dient dem Nachweis minimaler Resterkrankung, der Überwachung auf Rezidive sowie der Überprüfung des Ansprechens der Patienten auf (neo)adjuvante Behandlungen. Zudem unterstützt das Kit den Onkologen bei der Analyse des RAS-Mutationsstatus für die Entscheidung, ob Patienten mit kolorektalem Karzinom von einer Antikörpertherapie gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) profitieren könnten.

Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit darf zur Erfüllung des Verwendungszwecks ausschließlich mit der Plasma-SeqSensei™ IVD Software verwendet werden und muss von geschultem Personal in einer professionellen Laborumgebung angewendet werden. Die gewonnenen Informationen sollten niemals als alleinige Grundlage für medizinische Entscheidungen dienen.

**Hinweis:** *Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit ist nicht für das Screening oder die Krebsdiagnose vorgesehen.*

## 2 Einführung

Tumorzellen, bei denen es zu Apoptose, Nekrose oder metabolischer Sekretion kommt, geben minimale Mengen ihrer DNA in den Blutkreislauf ab. Die tumorspezifische Fraktion der cfDNA wird auch als zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) bezeichnet und enthält alle charakteristischen genetischen Informationen des Primärtumors und sogar der Metastasen. Zahlreiche Forschungsstudien und Versuche haben die klinische Anwendung des ctDNA-Profilings in unterschiedlichen Stadien der Krebsbehandlung demonstriert, darunter Therapieauswahl, Prognose und Überwachung (1).

Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit ist ein karzinomübergreifender Assay für 5 Gene zum Nachweis von Mutationen in humaner cfDNA bei einer großen Vielfalt solider Tumoren (Tabelle 1). Das Kit basiert auf der Technologie der Next-Generation-Sequenzierung und deckt wichtige Genmutationen in BRAF, EGFR, KRAS, NRAS und PIK3CA ab, um Tumormarker in mehreren Tumorentitäten nachzuweisen, z. B. kolorektales Karzinom, Lungenkarzinom, Brustkrebs, Schilddrüsenkrebs und Melanom.

BRAF-Mutationen sind die verantwortlichen Onkogene bei 1 bis 3 % der Fälle von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (klassische Form V600E (50 %)) (2), treten bei 8 bis 12 % (V600E gesamt) der Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom auf (wobei Überlappungen mit RAS-Mutationen so gut wie nicht auftreten) (3)(4) und liegen bei etwa 50 % aller Melanome (90 % dieser Mutationen treten bei Aminosäure 600 auf und der Großteil davon sind BRAF-V600E-Mutationen) (5) sowie bei Schilddrüsenkarzinomen vor (Frequenz bekannter somatischer Mutationen > 60 %) (6).

EGFR-Genmutationen (in Exons 18 bis 21, Kodierung für die interne Rezeptor-Tyrosinkinase(TK)-Domäne von EGFR und mit unterschiedlicher Fähigkeit zur Aktivierung von TK ohne Ligandenbindung) werden bei 10 bis 15 % der Adenokarzinome unter weißen Patienten (alle Fälle, unabhängig vom Raucherstatus in der Anamnese) und bei 40 bis 60 % der Adenokarzinome unter Patientenpopulationen in Ostasien berichtet (7).

KRAS-Mutationen sind relevant beim Adenokarzinom der Lunge (30 %, KRAS G12C macht ~44 % aller KRAS-Mutationen aus, was ~13 % aller Fälle von Adenokarzinom der Lunge entspricht) (8) und beim kolorektalen

## 2 Einführung

---

Karzinom (40 % in Exon 2, Codons 12 (70 bis 80 %) und 13 (15 bis 20 %)) – die verbleibenden Mutationen finden sich größtenteils in Exon 3, Codons 59 bis 61 und in Exon 4, Codons 117 und 146 (9).

NRAS-Mutationen spielen eine Rolle beim kolorektalen Karzinom (3 bis 5 % in Exon 2, Codons 12 und 13 sowie in Exon 3, Codon 61) (10), beim Melanom (20 %, der Großteil (>80 %) umfasst eine Punktmutation, die zum Austausch von Glutamin zu Leucin in Position 61) (11) und beim Schilddrüsenkrebs (Frequenz bekannter somatischer Mutationen von 6 bis 57 %) (6).

PIK3CA-Mutationen liegen in unterschiedlichen Anteilen beim Brustkrebs (49 % bei Luminal-A-Tumoren) (12), beim Lungenkrebs (2 bis 7 % in Exon 9 und Exon 20) (13) sowie beim kolorektalen Karzinom (7 bis 32 % in Exon 9 und Exon 20) vor (14).

In den vergangenen Jahren führte umfangreiche Forschung in den Bereichen kurative Chirurgie, (neo)adjuvante Therapie, Immuntherapie sowie zielgerichtete Therapie (basierend auf molekularem Profiling) zu einer Erhöhung des Patientenüberlebens.

Für den ctDNA-Nachweis sind verschiedene Technologien auf Basis von NGS verfügbar. Jedoch ist der Großteil aufgrund von Verzerrungen/Fehlern bei Sequenzierung und PCR für den Nachweis seltener Varianten nicht geeignet. Plasma-SeqSensei™ ist eine neuartige NGS-basierte Technologie, die eindeutige molekulare Kennungen (Unique Molecular Identifiers, UID) im Sequenzierungs-Workflow verwendet. Dadurch kommt es zu einer signifikanten Reduktion des Hintergrunds, was zu einer extrem hohen Sensitivität der Plasma-SeqSensei™-Technologie führt (15).

### 3 Testprinzip

Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit weist Genmutationen in aus Blutplasma isolierter ctDNA nach. Um die Sensitivität der Methode zu verbessern, werden DNA-Fragmente im ersten Amplifikationsschritt mit UIDs gekennzeichnet. Das führt zur Bildung von UID-Familien, die aus verschiedenen Kopien jeder zugewiesenen UID bestehen. Während des zweiten Amplifikationsschritts wird jedem Mitglied einer UID-Familie zusätzlich ein well- und plattenspezifischer Barcode zugewiesen (15). Zur Sicherstellung der Validität enthält jeder Lauf zusätzlich zu externen positiven und negativen Kontrollen eine interne Quantifikations-Inputkontrolle (Quantispike).

Der Workflow umfasst die automatische Datenanalyse und Berichterstellung mit der Plasma-SeqSensei™ IVD-Software. Die Software quantifiziert den cfDNA-Input und identifiziert Supermutanten. Das sind UID-Familien, in denen mindestens 90 % aller PCR-Fragmente identische Mutationen enthalten. Dieses Konzept ermöglicht die Unterscheidung echter Mutanten von PCR- oder Sequenzierungsartefakten, die nur in einer sehr geringen Anzahl an Mitgliedern einer UID-Familie vorliegen. Das Kernverfahren der Plasma-SeqSensei™-Technologie ist in Abbildung 1 dargestellt.

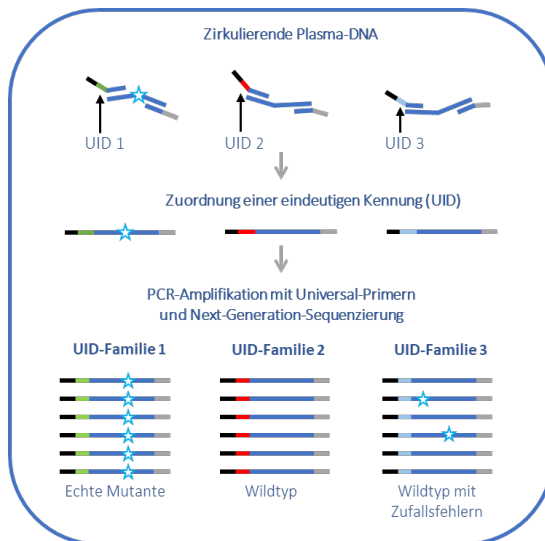


Abbildung 1: Prinzip der Plasma-SeqSensei™-Technologie

### 3 Testprinzip

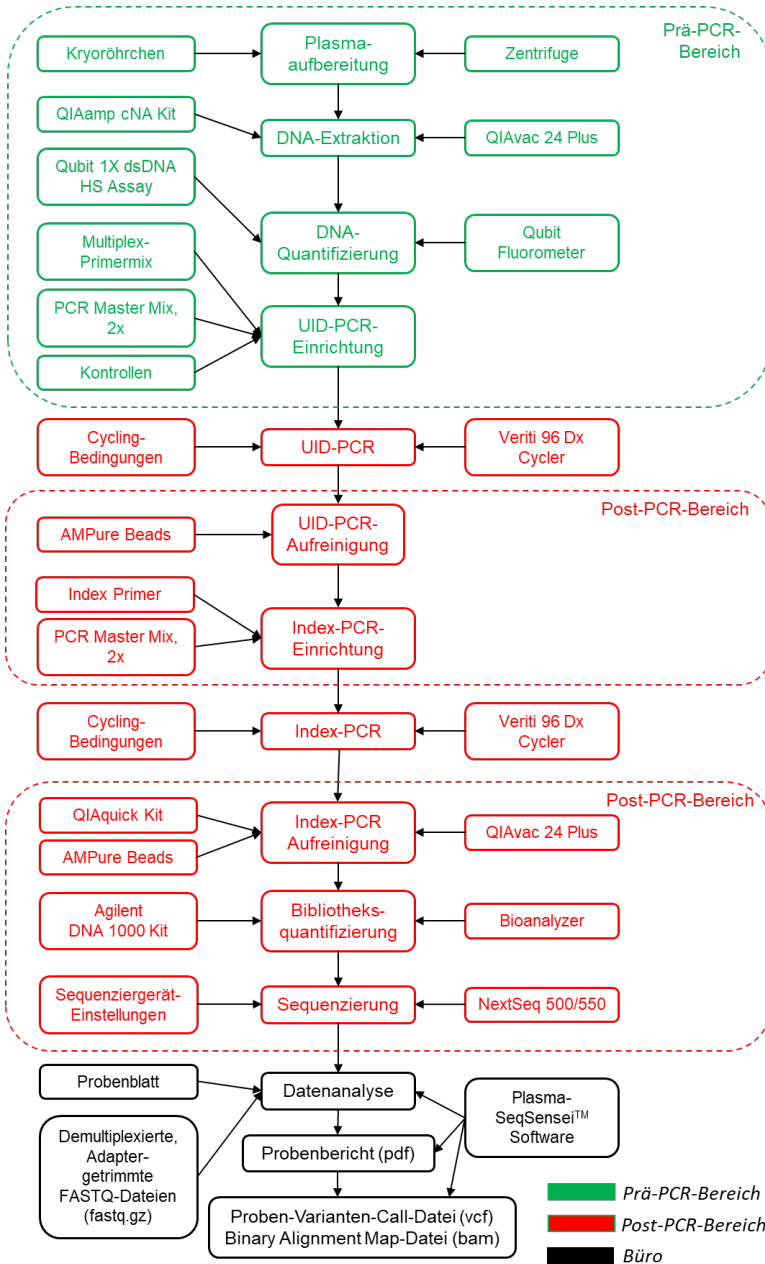


Abbildung 2: Workflow-Überblick der Plasma-SeqSensei™ Methode



## 4 Abgedeckte Regionen

**Tabelle 1: Abgedeckte Regionen beim Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit**

Gen	Transkript*	Start der Kodierungssequenz	Ende der Kodierungssequenz	Start der Aminosäure	Ende der Aminosäure
BRAF	ENST00000288602.6	1.383	1.431	462	477
BRAF	ENST00000288602.6	1.742	1.813	582	604
EGFR	ENST00000275493.2	2.116	2.177	706	725
EGFR	ENST00000275493.2	2.225	2.279	743	759
EGFR	ENST00000275493.2	2.284	2.325	762	775
EGFR	ENST00000275493.2	2.361	2.403	788	801
EGFR	ENST00000275493.2	2.565	2.620	856	873
KRAS	ENST00000256078.4	34	102	12	34
KRAS	ENST00000256078.4	169	228	57	76
KRAS	ENST00000256078.4	326	352	110	117
KRAS	ENST00000256078.4	419	445	141	148
NRAS	ENST00000369535.4	1	52	1	17
NRAS	ENST00000369535.4	162	210	55	70
NRAS	ENST00000369535.4	341	364	115	121
NRAS	ENST00000369535.4	420	449	141	149
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.611	1.659	538	553
PIK3CA	ENST00000263967.3	3.118	3.195	1.040	1.065

\* Quelle der Sequenz: Ensemble-Datenbank

### 5 Interpretation der Variantenergebnisse

Der Assay dient dem Nachweis somatischer Mutationen aus Plasma gewonnener ctDNA. Die Ergebnisse dieses Tests können als Ergänzung zu den Untersuchungen des behandelnden Arztes dienen und sollten daher im Zusammenhang mit den klinischen Befunden, der Tumorpathologie und anderen Labordaten von einer qualifizierten medizinischen Fachkraft interpretiert werden.

#### Mutationsfrequenzen:

Mutationsfrequenzen werden als MAF (mutierte Allelfraction) sowie als absolute Anzahl an MM (mutierten Molekülen) angegeben. MAF ist der Anteil mutierter ctDNA in Relation zur gesamten cfDNA. MAF kann verwendet werden, um das Vorliegen oder die Abwesenheit von Mutationen zu bestätigen. Jedoch spiegelt sie unter Umständen nicht die Gesamt-Tumorlast wider, da der Anteil an ctDNA in Relation zur gesamten cfDNA in einer Probe durch verschiedene Faktoren wie die anatomische Lage des Tumors, Tumorzell-Turnover, Vaskularität, Behandlung, Verfahren zur Blutprobenahme, Handhabung der Proben und den nicht mit dem Tumorstatus zusammenhängenden klinischen Eigenschaften des Patienten beeinflusst werden kann (16). Die absolute Anzahl an nachgewiesenen MM für eine bestimmte Variante stellt die Gesamtzahl der in einer Probe nachgewiesenen Moleküle dar und kann direkten Einblick in die patientenindividuellen Eigenschaften der Tumorbiologie liefern (16)(17).

#### Berichtete Varianten:

Varianten mit charakterisierten, wahrscheinlichen oder prognostizierten funktionellen Auswirkungen werden berichtet. Sie basieren auf öffentlich verfügbaren Datenbanken wie COSMIC (18) und/oder wissenschaftlicher Literatur mit Peer-Review (17)(19)(20). Zudem werden Varianten mit vermutetem Keimbahn-Ursprung basierend auf einer beobachteten MAF zwischen 40 % und 60 % oder einer beobachteten MAF über 90 % in einer separaten Tabelle im Bericht aufgeführt.

## 6 Einschränkungen

Vermutete Keimbahnmutationen werden basierend auf beobachteten MAF-Werten aus den Berichten über somatische Mutationen ausgeschlossen. Sie werden jedoch in einer separaten Tabelle aufgeführt und als mögliche Keimbahnmutationen markiert, da sich mit diesem Test ohne eine Analyse entsprechender gesunder Zellen nicht definitiv ermitteln lässt, ob diese Mutationen ihren Ursprung in der Keimbahn haben.

Zudem können Mutationen, die bei einer kleinen Untergruppe an Patientinnen für bestimmte Gene ausgegeben werden, das Ergebnis klonaler Hämatopoese sein, und es sollte eine ergänzende Analyse entsprechender Blutzellen durchgeführt werden.

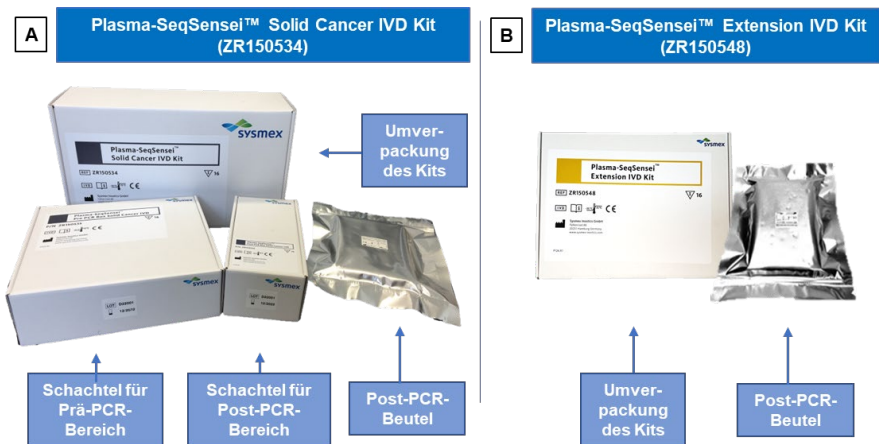
Die Nachweisbarkeit von ctDNA hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter Tumorlast, Tumorbilogie, Bedingungen der Probenahme, Heterogenität der Probe und klinischen Eigenschaften. Der Test weist je nach Sequenzkontext geringe, aber nachweisbare Variationen auf, insbesondere bei Proben mit Zielmolekülanzahl um den Cutoff-Wert.

Der Test erfasst Nukleotidveränderungen und die daraus resultierenden Änderungen der Aminosäure werden im Bericht dargestellt. Falls nur teils abgedeckte, aminosäure-verschlüsselnde Nukleotid-Triplets (Amplikongrenze) vorliegen, basiert die Aminosäure-Anmerkung im Bericht auf der Annahme, dass die vom Assay nicht abgedeckten Basen der Referenzsequenz entsprechen.

Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit wurde auf den Nachweis folgender Arten von somatischen Mutationen geprüft: Einzelnukleotidvarianten (Single-Nucleotide Variations, SNVs), Insertionen (bis zu 27 Nukleotide), Deletionen (bis zu 48 Nukleotide) und Deletionen/Insertionen (bis zu 17 Nukleotide).

## 7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

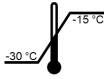
Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit umfasst zwei Schachteln und einen Beutel. Eine Schachtel sollte im Prä-PCR-Labor aufbewahrt werden, die andere Schachtel sowie der Beutel mit der Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate sollten im Post-PCR-Labor aufbewahrt werden. Es wird dringend empfohlen die Kit-Schachtel bei Eintreffen auf zwei separate Labore aufzuteilen, um das Risiko einer Kontamination der Reagenzien zu minimieren. Die Prä-PCR-Schachtel ist für die Nutzung in einem Labor vorgesehen, in dem keine amplifizierte DNA gehandhabt wird. Die Post-PCR-Schachtel und der Beutel sind für die Nutzung in einem Labor vorgesehen, in dem PCR-Reaktionsgefäße/-platten geöffnet und gehandhabt werden.



**Abbildung 3: Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit Schachteln mit Beutel (A) und Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit Schachtel mit Beutel (B) mit ihren jeweiligen Aufbewahrungsorten (Prä-/Post-PCR-Bereiche).**

## 7.1 Mitgelieferte Materialien

Die mitgelieferten Materialien sind für den Assay essenziell und können nicht durch andere Produkte ersetzt werden.



Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit muss bei einer Temperatur zwischen -15 °C und -30 °C gelagert werden, wenn es nicht verwendet wird.



Nach dem Öffnen sind die Reagenzien 30 Tage oder bis zum Haltbarkeitsdatum stabil, je nachdem, was zuerst eintritt (Wasser ausgenommen).

**Tabelle 2: Mitgelieferte Materialien im Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit (ZR150534)**

Schachtel	Bezeichnung * (Deckelfarbe)	Artikelnummer	Röhrchen	Einfrier-/ Auftauzyklen	Lagerungstemperatur
Prä-PCR-Schachtel	Solid Cancer Mpx A (blau)	ZR851015	4	2	-15 °C bis -30 °C
	Solid Cancer Mpx B (gelb)	ZR851016	4	2	-15 °C bis -30 °C
	Solid Cancer Positive Control (rot)	ZR855007	4	2	-15 °C bis -30 °C
	No Template Control (transparent)	ZR854002	4	2	-15 °C bis -30 °C
	Quantispike (grün)	ZR856001	4	2	-15 °C bis -30 °C
	PCR Master Mix, 2x (violett)	ZR230002	4	4	-15 °C bis -30 °C
Post-PCR-Beutel	Index Primer Plate IND34 <sup>1,2</sup>	ZR852004	1	n. z.	-15 °C bis -30 °C
Post-PCR-Schachtel	PCR Master Mix, 2x (violett)	ZR230002	2	4	-15 °C bis -30 °C
	Water, nuclease-free (transparent/weiß)	ZR224006	1	n. z.	-15 °C bis -30 °C

\* Namen können abweichen durch das Hinzufügen von PSS vor dem Namen, je nachdem welche Kit-Charge verwendet wird.



<sup>1</sup> Platten vor Lichteinwirkung schützen. Nach der ersten Verwendung muss die Index Primer Plate bei einer Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden.

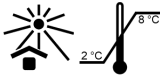
<sup>2</sup> Index Primer Plate IND34 wird im Workflow und in der Plasma-SeqSensei™ IVD Software auch als Platte A bezeichnet.

Falls bei einem Sequenzierungslauf mehr als 16 Proben analysiert werden, muss ein Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit bestellt werden.

**Tabelle 3: Mitgelieferte Materialien im Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit (ZR150548)**

Schachtel	Bezeichnung* (Deckelfarbe)	Artikelnummer	Röhrchen	Einfrier-/ Auftauzyklen	Lagerungstemperatur
Post-PCR-Beutel	Index Primer Plate IND35 <sup>1,2</sup>	ZR852005	1	n. z.	-15 °C bis -30 °C

\* Namen können abweichen durch das Hinzufügen von PSS vor dem Namen, je nachdem welche Kit-Charge verwendet wird.



<sup>1</sup> Platten vor Lichteinwirkung schützen. Nach der ersten Verwendung muss die Index Primer Plate bei einer Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden.

<sup>2</sup> Index Primer Plate IND35 wird im Workflow und in der Plasma-SeqSensei™ IVD Software auch als Platte B bezeichnet.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der mitgelieferten Materialien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Solid Cancer Mpx A	Primer Tris EDTA Buffer
Solid Cancer Mpx B	Primer Tris EDTA Buffer
Solid Cancer Positive Control	Double-stranded synthetic DNA wild-type/mutant Tris EDTA Buffer Carrier RNA
No Template Control	Tris EDTA Buffer
Quantispike	Double-stranded synthetic DNA Tris EDTA Buffer Carrier RNA
Index Primer Plate	Index primers (well-specific) Bromophenol blue
PCR Master Mix, 2x	Hot-Start Polymerase PCR Buffer dNTPs
Water, nuclease-free	Nuclease-free water, molecular biology grade



Alle flüssigen und getrockneten Komponenten des Kits sind nur für den Einmalgebrauch bestimmt. Alle Wells der Index Primer Plate sind für den Einmalgebrauch bestimmt.

Die Reagenzien in den Röhrcchen sind für den mehrmaligen Gebrauch vorgesehen, da sie gemäß Tabelle 2 aufgetaut und eingefroren werden können, um Flüssigkeit für die angegebenen Workflow-Schritte zu extrahieren.

### 7.2 Nicht mitgelieferte Materialien

Produkte, für die in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 Angaben zum Hersteller/Anbieter und zur Artikelnummer aufgeführt sind, sind für den Assay essenziell und dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.

**Tabelle 5: Nicht mit dem Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit mitgelieferte Materialien**

Material	Produkt
Reagenzien und Kits	Ethanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	RNase- and DNase free distilled water
	* Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, Nr. A63881
	* Buffer EB (Elutionspuffer), QIAGEN, Nr. 19086
	* QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN, Nr. 28104 oder Nr. 28106
	* Buffer PB, QIAGEN, Nr. 19066
	* DNA 1000 Kit, Agilent, Nr. 5067-1504 <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mikrofluidische Chips</li> <li>■ Reagenzien</li> </ul>
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, Nr. Q33230 (100 Assays) oder Nr. Q33231 (500 Assays)
	Natriumhydroxid (NaOH), 1 M
	Trizma® Hydrochloridlösung pH 7,0, 1 M
* NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Zyklen), Illumina, Nr. 20024904 Bestandteile des Kits: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mid Output Reagenzienkartusche (150 Zyklen), Nr. 15057940</li> <li>■ Mid Output Fließzellenkartusche, Nr. 20022409</li> <li>■ Pufferkartusche, Nr. 15057941</li> <li>■ Hybridisierungspuffer (HT1), Nr. 15058251</li> </ul>	

## 7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Material	Produkt
Reagenzien und Kits	<p>* NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Zyklen), Illumina, Nr. 20024907</p> <p>Bestandteile des Kits:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ High Output Reagenzienkartusche (150 Zyklen), Nr. 15057931</li> <li>■ High Output Fließzellenkartusche, Nr. 20022408</li> <li>■ Pufferkartusche, Nr. 15057941</li> <li>■ Hybridisierungspuffer (HT1), Nr. 15058251</li> </ul>

\* Essenzielle Komponenten; dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.

### 7.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6: Für das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit benötigte Verbrauchsmaterialien**

Laborausrüstung	Produkt
Pipettenspitzen/serologische Pipetten	Aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter, 2, 10, 20, 200, 1.000 µl
Reaktionsgefäße	Röhrchen mit 15, 5, 2, 1,5 ml
	* LoBind® DNA-Röhrchen 1,5 ml, Eppendorf, Nr. 0030108051
	* Qubit™ Assay-Röhrchen, Thermo Fisher, Nr. Q32856
	Röhrchenkettens plus Deckel (1,3 ml)
96-Well-Platten	* PCR-Platte, 96 Wells, segmentiert, Halbrand, Thermo Scientific, Nr. AB0900 oder Nr. AB2400 (benötigt für PCR)
	96-Well-PCR-Platte Multiply® ohne lateralen Rand, Sarstedt (optional, nur für Verdünnungen)
Folie für 96-Well-Platten	Aluminiumfolie
	Transparenter Klebefilm
Sicherheitsausrüstung	Laborkittel, Ärmelschoner, Schutzbrille, Einmal-Überschuhe, Handschuhe
Verschiedenes	Einmal-Behälter für Reagenzien (25 ml)
	* 3-ml-Erweiterungsröhrchen für QIAvac Vakuumverteiler, QIAGEN, Nr. 19587
	* VacConnectors (500) für QIAvac Vakuumverteiler, QIAGEN, Nr. 19407

\* Essenzielle Komponenten; dürfen nicht durch Produkte vergleichbarer Qualität und/oder Eigenschaften ersetzt werden.



7.4 Geräte

**Tabelle 7: Für das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit benötigte Geräte**

Laborausrüstung	Produkt
Elektronische Instrumente	Zentrifuge für 1,5/2-ml-Röhrchen, bis zu 20.000 × g, Festwinkelrotor
	Zentrifuge für 15/50-ml-Röhrchen, bis zu 7.197 × g, Festwinkelrotor
	Zentrifuge für 96-Well-Platten, bis zu 1.000 × g, Festwinkelrotor
	Mini-Zentrifuge bis zu ≤ 2.000 × g
	Vortexer mit Einsätzen für Röhrchen und 96-Well-Platten
	Vortexer mit Einsatz für Agilent DNA Chips, bis zu 2.400 U/min
	Gefrierschrank, -15 °C bis -30 °C
	Kühlschrank, 2 °C bis 8 °C
	DNA-Werkbank/PCR-Kabinett
	Abzugshaube (dringend empfohlen)
	Sicherheitskabinetts der Klasse II für biologische Proben (dringend empfohlen)
	QIAGEN Connecting System
	QIAvac 24 Plus System
	Vakuumpumpe (230 V, 50 Hz)
	Veriti Dx 96-well Thermal Cycler oder gleichwertiges Gerät <sup>¶</sup>
	Agilent 2100 Bioanalyzer System
	Chip Priming Station, Agilent, Nr. 5065-4401
	Illumina NextSeq™ 500/550
	2100 Expert Software, Agilent Technologies
	Pipetten
8- oder 12-Kanal-Pipette, 200 µl, 20 µl	
Pipette 5 bis 100 ml	
Racks	Röhrchenrack 50 ml, 15 ml, 5 ml, 1,5/2 ml
	Röhrchenkettentrack
	96-Well-Rack
	96S Super Magnetplatte, Alpaqua® Pos.: A001322

## 7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

---

Laborausrüstung	Produkt
	DynaMag™-2 Magnet, Thermo Fisher, Nr. 12321D
	Lagerboxen für den Gefrierschrank
Verschiedenes	Folien-Applikator
	Stoppuhr

▪ Die Gleichwertigkeit muss durch den Benutzer ermittelt werden; der Benutzer trägt das Risiko für die Verwendung anderer Thermocycler.

## 8 Lagerung und Handhabung

### 8.1 Transportbedingungen

Das Produkt wird auf Trockeneis verschickt. Prüfen Sie bei Ankunft, ob sich noch Trockeneis in der Box befindet und die Reagenzien gefroren sind.

### 8.2 Generelle Vorsichtsmaßnahmen für die Handhabung



Stellen Sie sicher, dass Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Laboren stets zwischen 15 °C und 25 °C bzw. 20 % und 85 % liegen (verringert das Risiko von Kondensation/Verdampfung).

Im Laborbereich darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Die verwendeten Geräte müssen gemäß den Herstelleranweisungen gewartet werden.

Die Dekontamination und die Entsorgung aller Reagenzien, Proben und weiterer verwendeter Materialien müssen unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen erfolgen. Für die Bestimmung genauer und reproduzierbarer Ergebnisse ist es sehr wichtig, jegliche Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden, insbesondere mit PCR-Produkten von vorher bearbeiteten Platten. Die häufigste Quelle für eine DNA-Kontamination sind die amplifizierten Produkte aus vorangegangenen Tests.

Die mitgelieferten Reagenzien sind transparent und farblos, mit Ausnahme der Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate, die in allen Wells Bromphenolblau enthält (blaue Farbe). Beachten Sie bei Veränderungen des Aussehens des Materials oder bei Verdacht auf Degradation aufgrund von falscher Lagerung mit möglichen Auswirkungen auf die Leistung des Assays die technische Unterstützung (► Kapitel 10 *Technische Unterstützung*, Seite 53/62).

### 8.3 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Produkt enthält keine Gefahrstoffe.



Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, MSDS) sind verfügbar unter <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/>.

Wenn im Zusammenhang mit dem Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit ein schwerwiegender Zwischenfall aufgetreten ist, muss es umgehend dem Hersteller und der zuständigen Behörde im Mitgliedsstaat der Europäischen Union gemeldet werden, in dem sich Benutzer und/oder Patient befinden.

#### 8.3.1 Besondere Maßnahmen

Erste-Hilfe-Maßnahmen

- **Genereller Rat:** Holen Sie im Fall persistierender Wirkungen ärztlichen Rat ein. Legen Sie kontaminierte Kleidung und Schuhe umgehend ab und waschen Sie sie gründlich vor dem nächsten Gebrauch.
- **Bei Einatmung:** Entfernen Sie die betroffene Person aus der unmittelbaren Umgebung. Stellen Sie ausreichende Frischluftzufuhr sicher.
- **Bei Hautkontakt:** Waschen Sie die betroffene Stelle mit Seife und viel Wasser ab.
- **Bei Augenkontakt:** Entfernen Sie Kontaktlinsen. Spülen Sie das Auge mindestens 10 bis 15 Minuten gründlich unter fließendem Wasser aus und halten Sie dabei die Augenlider offen. Schützen Sie das nicht betroffene Auge.
- **Bei Verschlucken:** Rufen Sie umgehend einen Arzt. Rufen Sie kein Erbrechen hervor. Einer bewusstlosen Person darf keinesfalls etwas über den Mund verabreicht werden.

#### 8.3.2 Handhabung und Lagerung

Allgemeine Schutz- und Hygienemaßnahmen

Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Vor dem Verlassen muss eine gute Händewaschtechnik angewendet werden. Dämpfe nicht einatmen. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Verschmutzte oder nasse Kleidung umgehend ablegen.

### Schutzmaßnahmen zur sicheren Handhabung

Die Risiken bei der Handhabung des Produkts müssen durch angemessene Schutz- und Vorsichtsmaßnahmen minimiert werden. Beim Arbeitsverfahren müssen die Freisetzung von gefährlichen Substanzen oder Hautkontakt so weit wie möglich ausgeschlossen werden.

### Hinweise zum Schutz vor Feuer und Explosionen

Keine besonderen Maßnahmen erforderlich.

### Bedingungen zur sicheren Lagerung, einschließlich etwaiger Unverträglichkeiten



Den Behälter dicht geschlossen an einem trockenen, gut belüfteten Ort lagern. Geöffnete Behälter müssen sorgfältig wieder verschlossen und aufrecht stehend gelagert werden, um Auslaufen zu verhindern.

### **8.3.3 Vorsichtsmaßnahmen für die Reagenzienhandhabung**



Um die korrekte Verwendung und Entsorgung von Reagenzien zu gewährleisten und eine Kontamination von Reagenzien zu vermeiden, befolgen Sie die nachfolgend aufgeführten Vorsichtsmaßnahmen:

- Keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Reagenzien verwenden.
- Reagenzien gemäß den Angaben vorbereiten.
- Reagenzien dürfen nur zusammen mit den anderen Reagenzien aus dem gleichen Kit verwendet werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen dürfen nicht vermischt oder ausgetauscht werden.
- Öffnungsdatum dokumentieren und Röhrchen nach jeder Verwendung markieren, um zu gewährleisten, dass die Reagenzien das Verfallsdatum und die empfohlene Anzahl von Einfrier-/ Auftauzyklen nicht überschritten haben.
- Kontamination von Reagenzien durch häufigen Handschuhwechsel vermeiden. Handschuhe immer zwischen der Handhabung von Proben und Reagenzien wechseln.
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall gemäß den nationalen, regionalen und örtlichen Vorschriften entsorgen.

### 8.3.4 Sicherheit und Kontaminationsvorbeugung



Befolgen Sie die nachfolgend aufgeführten Vorsichtsmaßnahmen, um die Laborumgebung frei von DNA-Kontaminationen zu halten und die Sicherheit aller Mitarbeiter zu gewährleisten:

- Getrennte Laborarbeitsbereiche für die Prä-PCR- und Post-PCR-Verfahren nutzen und einen Arbeitsablauf in nur eine Richtung von „sauber“ (Prä-Amplifikation) zu „verschmutzt“ (Post-Amplifikation) einhalten.
- Sicherstellen, dass in jedem Arbeitsbereich eigene, dedizierte Instrumente (einschließlich Pipetten), Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Behälter für biogefährlichen Abfall und Laborhandbücher vorhanden sind. Diese Materialien keinesfalls zwischen dem Prä-PCR- und dem Post-PCR-Arbeitsbereich austauschen. Wir empfehlen eine farbliche Codierung oder Beschriftung der Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, um deutlich zu machen, dass diese zu einem bestimmten Bereich gehören.
- Während des gesamten Verfahrens immer angemessene persönliche Schutzausrüstung tragen.
  - Bei der Arbeit im Prä-PCR- und Post-PCR-Bereich immer Laborkittel (vorzugsweise Einmal-Produkte) und puderfreie Einmal-Handschuhe tragen.
  - Um Kontamination zu vermeiden, Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und Reagenzien häufig und außerdem nach Kontakt der Handschuh-Außenseite mit der Haut wechseln.
  - Mindestens bei der Plasmaaufbereitung, DNA-Extraktion und PCR-Produktaufreinigung mit QIAquick® Schutzbrille tragen.
  - Einmal-Überschuhe tragen oder Schuhe zwischen Prä- und Post-PCR-Labor wechseln und Einmal-Ärmelschoner tragen (obligatorisch im Prä-PCR-Labor und empfohlen im Post-PCR-Labor, insbesondere für die UID-PCR-Aufreinigung und Index-PCR).
- Die persönliche Schutzausrüstung vor dem Verlassen des Prä-PCR- bzw. des Post-PCR-Labors ablegen und entsorgen.

- Alle Proben sind als potenziell infektiöse Substanz zu behandeln. Nach dem Verschütten von Flüssigkeiten ist es empfehlenswert, den betroffenen Bereich erst mit Reinigungsmittel/Desinfektionsmittel sowie Wasser und anschließend mit 0,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung (Bleiche, zubereitet mit entionisiertem Wasser) zu reinigen.

**Hinweis:** *Übliche flüssige Haushaltsbleiche (z. B. der Marke Clorox) enthält meistens Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Eine 1:10-Verdünnung solcher Haushaltsbleiche ergibt eine 0,5%ige Natriumhypochlorit-Lösung.*

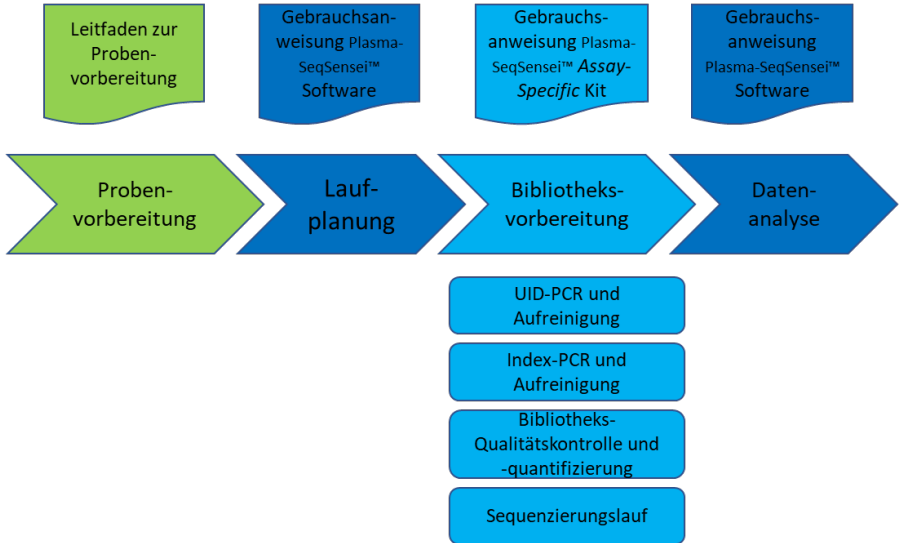
- Für die Pipettierschritte dedizierte PCR-Kabinetts verwenden.
- PCR-Kabinetts nach Gebrauch mit Desinfektionsmittel mit quartären Ammoniumverbindungen (wie RHEOSEPT-WD plus oder gleichwertige Produkte) und daraufhin mit einem Produkt für die Entfernung von Nukleinsäuren und Nukleasen (wie Roti® Nukleinsäurefrei oder gleichwertige Produkte) reinigen.
- PCR-Arbeitsbereiche nach Gebrauch mit einem Produkt für die Entfernung von Nukleinsäuren und Nukleasen (wie Roti® Nukleinsäurefrei oder gleichwertige Produkte) reinigen.
- Sicherheitskabinett, PCR-Arbeitsplätze und Laborutensilien (Pipetten, Racks und andere Geräte) nach dem Einsatz mit ultraviolettem (UV) Licht dekontaminieren. Um eine effektive UV-Strahlung sicherzustellen, UV-Leuchtmittel regelmäßig von Ablagerungen reinigen.
- Nur aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden (mit Chargenzertifizierung, RNase-, DNase- und pyrogenfrei).
- Nur PCR-geeignete Reagenzien und Röhrchen verwenden.
- Es sollte immer nur ein Probenröhrchen oder Reagenzröhrchen zu einem bestimmten Zeitpunkt geöffnet sein.
- Um eine Kontamination von Reagenzien für mehr als eine Verwendung zu vermeiden, geeignete Aliquots nach Anleitung vorbereiten und direktes Pipettieren vermeiden.

## 9 Workflow

Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit verwendet quantifizierte cfDNA aus Plasma zum Nachweis von ctDNA. Stellen Sie vor Beginn des Workflows für die Bibliotheksvorbereitung (Abbildung 4) wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben sicher, dass der Workflow für die Probenvorbereitung wie im Leitfaden zur Probenvorbereitung von Sysmex Inostics beschrieben abgeschlossen wurde.

Zudem muss der erste Teil der Gebrauchsanweisung für die Plasma-SeqSensei™ IVD Software (Laufplanung) abgeschlossen sein. Wenn Proben aufgrund eines zu hohen DNA-Gehalts verdünnt werden müssen, beachten Sie ► 9.1 UID-PCR (Multiplex-PCR), Seite 24/62 in dieser Gebrauchsanweisung.

Abbildung 4 beschreibt das Verfahren einschließlich einzelner Workflow-Schritte sowie die zu befolgende Gebrauchsanweisung oder die zu befolgenden Leitfäden für das gesamte Plasma-SeqSensei™ Verfahren.



**Abbildung 4: Plasma-SeqSensei™ Verfahren einschließlich Workflow-Schritte und erforderlicher Dokumente.**





Jedes Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit kann bis zu 16 Proben auf einer Platte analysieren.

Wenn mehr als 16 Proben im selben Sequenzierungslauf bearbeitet werden sollen, muss ein zweites Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit sowie ein Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit erworben werden.

Verwenden Sie für Proben auf der zweiten Platte (Proben 17 bis 32) die Index Primer Plate **IND35 (Platte B)** aus dem Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit anstelle der Index Primer Plate IND34 (Platte A) aus dem ursprünglichen Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit.



**Warnung:** *Wenn dieselbe Plasma-SeqSensei™ Primer Plate (z. B. IND34) zweimal im selben Lauf verwendet wird, können die Ergebnisse nicht analysiert werden.*

Wenn zwei Platten verwendet werden sollen, darf immer nur eine Platte für jeden Schritt des Workflows vorbereitet werden, bevor die zweite folgt. Jede Platte enthält eine Positive Control (PC) und eine No Template Control (NTC).

**Hinweis:** *Verwenden Sie immer das kleinste mögliche Sequenzierungskit. Das NextSeq™ High Output kit v2.5 kann nur mit 5 oder mehr Proben verwendet werden.*

## 9.1 UID-PCR (Multiplex-PCR)

In der Multiplex-UID-PCR werden alle Zielregionen co-amplifiziert und eindeutige molekulare Barcodesequenzen eingeführt. UIDs ermöglichen eine signifikante Hintergrundverringerung und führen zur extrem hohen Sensitivität der Plasma-SeqSensei™ Technologie.

Mit dem Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit können Proben mit einem DNA-Input zwischen 5,7 und 95 ng/116 µl analysiert werden. Proben mit höherem DNA-Gehalt müssen verdünnt werden. Proben mit weniger als 5,7 ng/116 µl wurden nicht validiert und werden zu ungültigen Ergebnissen führen.

**Hinweis:** *Die Qubit-Messung der Proben stellt nur eine grobe Schätzung der Input-DNA dar, um die Probenladung zu bestimmen. Die endgültige und möglicherweise abweichende Quantifizierung der Proben erfolgt im Laufe der Sequenzierung der Bibliothek mit dem internen Quantifizierer (Quantispike).*

**Empfehlung:** Für optimale Ergebnisse empfehlen wir einen **DNA-Input von 43 ng/116 µl pro Probe, sofern möglich, selbst bei Proben mit oder unter 95 ng/116 µl.**

Benötigte Kits und Reagenzien:

- **Solid Cancer Mpx A** (blauer Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR851015
- **Solid Cancer Mpx B** (gelber Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR851016
- **Solid Cancer Positive Control** (roter Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR855007
- **No Template Control** (transparenter Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR854002
- **Quantispike** (grüner Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR856001
- **PCR Master Mix, 2x** (violetter Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR230002

Die folgenden Schritte werden im Probenvorbereitungsbereich im Prä-PCR-Labor durchgeführt.

Vorbereitung:

- Alle gefrorenen Reagenzien, DNA-Proben und Kontrollen:
  - Auftauen
  - 5 Sekunden vortexen
  - 2 Sekunden zentrifugieren
- Proben auf Gesamt-DNA-Gehalt prüfen.  
Bei zu hohem Gesamt-DNA-Gehalt (z. B. > 95 ng/116 µl) die Probe nach der unten angegebenen Berechnung verdünnen.
- LoBind® Röhrchen 1,5 ml für alle zu verdünnenden Proben kennzeichnen.
- Probenröhrchenkettens eindeutig gemäß Plattenlayout kennzeichnen.

### Verdünnung der DNA:

Wenn die DNA-Konzentration die maximale Zugabe von 95 ng/116 µl überschreitet oder nah an der Obergrenze liegt, empfehlen wir, gemäß nachstehender Berechnung ein neues Röhrchen mit einer Probe vorzubereiten, die auf **43 ng/116 µl** verdünnt ist:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Gemessene Konzentration in ng/116 } \mu\text{l}}{43 \text{ ng/116 } \mu\text{l}}$$

$$\text{Erforderliches Eluatvolumen } [\mu\text{l}] = \frac{135 \mu\text{l}}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

bei einem Gesamtvolumen von 135  $\mu\text{l}$  (Details siehe ► Kapitel 4.2 Aufreinigung zirkulierender DNA aus Plasma im Leitfaden zur Probenvorbereitung)

$$\text{AVE Puffervolumen } [\mu\text{l}] = 135 \mu\text{l} - \text{erforderliches Eluatvolumen}$$

$$\begin{aligned} \text{Verdünnte Probe } [135 \mu\text{l}] \\ = \text{erforderliches Eluatvolumen} + \text{AVE Puffervolumen} \end{aligned}$$

**Hinweis:** AVE Buffer für die Verdünnung der Probe ist Bestandteil des QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kits (QIAGEN) (für weitere Informationen siehe ► Kapitel 4.2 Aufreinigung zirkulierender DNA aus Plasma des Leitfadens zur Probenvorbereitung).

#### Erneute Quantifizierung verdünnter Proben:

Quantifizieren Sie bei verdünnten Proben die Verdünnungen erneut mit Qubit™ gemäß ► Kapitel 4.3 Probenquantifizierung (Qubit™) des Leitfadens zur Probenvorbereitung.

#### Ansetzen der UID-PCR:

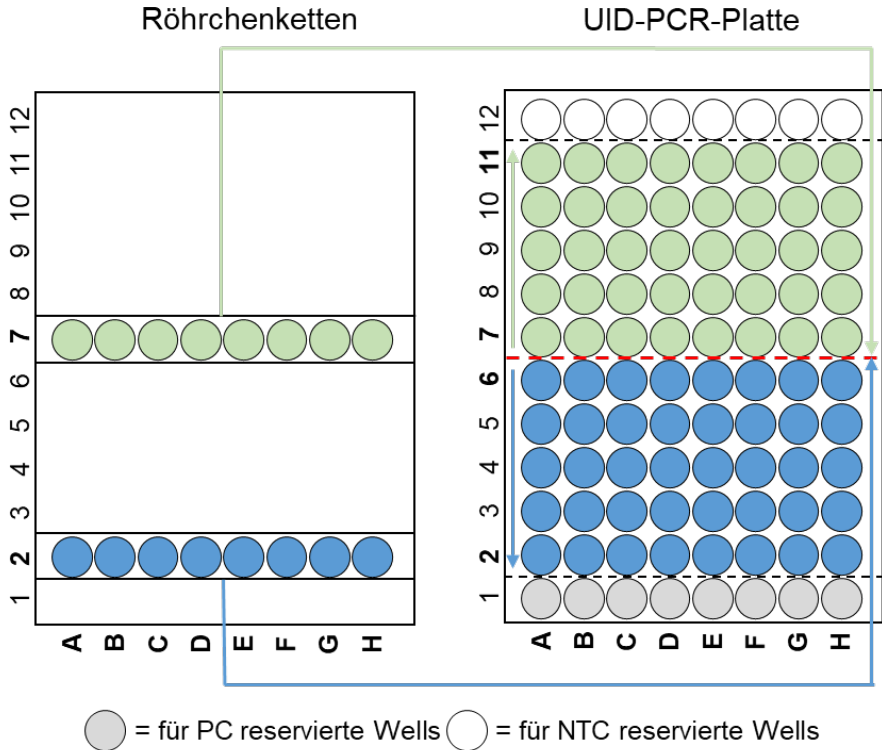
**Hinweis:** Isolierte DNA aus Plasmaproben wird in 5 Replikaten/Wells einer Multiplex-PCR unterzogen. Positiv- und Negativ-Kontrolle werden in einzelnen Replikaten analysiert (Spalte 1 und 12).

**Hinweis:** Proben werden der UID-PCR-Platte mit einer Mehrkanal-Pipette Spalte für Spalte hinzugefügt, wie in Abbildung 5 dargestellt (zur Vorbeugung vor Kontamination). Die Probenröhrchenketten müssen parallel zur UID-PCR-Platte angeordnet werden.

## 9 Workflow

**Hinweis:** Achten Sie darauf, während des Workflows keine Proben zu vermischen.

**Hinweis:** Bei Verarbeitung von mehr als 16 Proben immer nur für eine Platte gleichzeitig die UID-PCR anzusetzen.



**Abbildung 5: Pipettierschema beim Pipettieren von den Röhrenketten in eine UID-PCR-Platte**

1. Bereiten Sie den UID PCR Working Mix pro Platte gemäß Tabelle 8: „UID PCR Working Mix“ vor. Mischen Sie durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren unter Verwendung einer Einkanal-Pipette. Das für PC und NTC erforderliche Volumen an UID PCR Working Mix ist in den Berechnungen berücksichtigt (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Pipettierschema des UID PCR Working Mix pro Platte**

Anzahl der Proben (1 Probe = 5 Replikate), mit 15 % Überschuss	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix, 2x [µl]	400	567	734	900	1067	1234	1401	1567
Solid Cancer Mpx A [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Solid Cancer Mpx B [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Quantispike [µl]	3,0	4,3	5,6	6,8	8,1	9,4	10,6	11,9
Endvolumen (Summe)	481,0	681,3	881,6	1080,8	1281,1	1481,4	1681,6	1880,9

Anzahl der Proben (1 Probe = 5 Replikate), mit 15 % Überschuss	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix, 2x [µl]	1734	1901	2068	2234	2401	2568	2735
Solid Cancer Mpx A [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Solid Cancer Mpx B [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Quantispike [µl]	13,2	14,4	15,7	17,0	18,2	19,5	20,7
Endvolumen (Summe)	2081,2	2281,4	2481,7	2681,0	2881,2	3081,5	3281,7

**Hinweis:** Das Volumen für eine PC und eine NTC ist bereits enthalten.

- Geben Sie 34,8 µl UID PCR Working Mix in die Wells in Spalte 1 und 12 gemäß Plattenlayout.
- Geben Sie 23,2 µl Positive Control in das Well in Spalte 1 gemäß Plattenlayout und mischen Sie die PC durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren.

Geben Sie 23,2 µl Negative Control in das Well in Spalte 12 gemäß Plattenlayout und mischen Sie die NTC durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren.

- Aliquotieren Sie 187,5 µl UID PCR Working Mix für jede Probe in eine Röhrenkette.
- Geben Sie 125 µl der Probe in das entsprechende Röhrenchen in der Röhrenkette und mischen Sie durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren.
- Aliquotieren Sie mit der 200-µl-Mehrkanal-Pipette 58 µl Probe + Working Mix in 5 Wells gemäß Plattenlayout.

7. Verschließen Sie die Platte mit PCR-Klebefolie und zentrifugieren Sie sie 5 Sekunden lang bei 1.000 x g.
8. Stellen Sie die Platte in den PCR-Cycler. Starten Sie den Cycler, melden Sie sich an und starten Sie innerhalb von 15 Minuten das Cycling-Programm „UID SC\_v1“ (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Zeit-Temperatur-Profil von UID SC\_v1**

PCR-Cycler: Veriti

Volumeneinstellung: 50 µl

Heizdeckel Deckeltemperatur 96 °C

Nr.	T [°C]	Zeit [mm:ss]	Weiter mit Nr.	Anzahl Zyklen
1	98	02:00	n. z.	1
2	98	00:20	n. z.	13
3	63	01:30	n. z.	13
4	72	00:10	2	13
5	72	02:10	n. z.	1
6	4	∞	n. z.	1

9. Wenn mehr als 16 Proben bearbeitet werden, wiederholen Sie das UID-PCR-Verfahren mit einer zweiten UID-PCR-Platte beginnend bei Schritt 1.
10. Lagern Sie die UID-PCR-Platte im Post-PCR-Labor bei einer Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C bis zu 14 Tage oder zwischen -15 °C und -30 °C bis zu 2 Monate lang oder fahren Sie direkt mit der UID-PCR-Aufreinigung fort (► Kapitel 9.2 *UID-PCR-Aufreinigung*, Seite 30/62).



**Tabelle 11: Vorbereiten von 70%igem EtOH**

	Halbe Platte (8 Proben)	Ganze Platte (16 Proben)
EtOH (≥ 99,8 %, p.a.)	9,1 ml	17,5 ml
Destilliertes Wasser	3,9 ml	7,5 ml
Gesamt	13 ml	25 ml

- Equilibrieren Sie die Beads auf 15 °C bis 25 °C (ca. 30 min) und resuspendieren Sie sie, indem Sie die Flasche horizontal auf der Arbeitsoberfläche rollen. Rollen Sie die Flasche langsam, halten Sie nach jeder Drehung um 180 Grad an und warten Sie, bis die Flüssigkeit heruntergelaufen ist. Wiederholen Sie den Vorgang, bis die Beads homogen resuspendiert sind und keine Streifen mehr zu sehen sind. Drehen Sie die Flasche gelegentlich um. Die Bead-Flasche nicht vortexen.
- Füllen Sie AMPure® Beadlösung (Tabelle 12) mit einer 1-ml-Pipette in ein Reservoir.

**Tabelle 12: Benötigtes Volumen an AMPure® Beads**

Halbe Platte (8 Proben)	Ganze Platte (16 Proben)
4,4 ml	8,3 ml

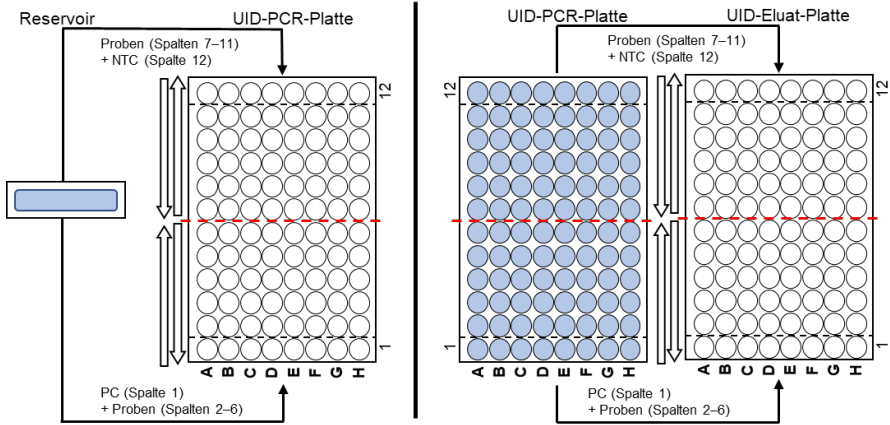
- Wenn zwei UID-PCR-Platten verwendet werden sollen, darf der UID-PCR-Aufreinigungsworkflow immer nur für eine Platte gleichzeitig durchgeführt werden.

Aufreinigungsverfahren:

1. Verwenden Sie für die folgenden Schritte eine Mehrkanal-Pipette. Die UID-PCR- und UID-Eluat-Platten müssen parallel zueinander angeordnet sein und die Pipettierung findet nach Spalten statt (nicht nach Zeilen, Abbildung 6).

**Hinweis:** Führen Sie alle Schritte durch, indem Sie von links nach rechts pipettieren.





**Abbildung 6: Pipettierschema beim Pipettieren vom Reservoir in die UID-PCR-Platte (links) oder von der UID-PCR-Platte (rechts) in eine UID-Eluat-Platte.**

2. Füllen Sie 81  $\mu\text{l}$  AMPure<sup>®</sup> Beads in jedes Well der UID-PCR-Platte und mischen Sie durch 10-maliges langsames Auf- und Abpipettieren.

**Hinweis:** Resuspendieren Sie die AMPure<sup>®</sup> Beads vor jeder Aspiration 3-mal im Reservoir.

**Hinweis:** Stellen Sie sicher, dass die Beads nie austrocknen.

3. Inkubieren Sie die UID-PCR-Platte 10 Minuten lang bei 15 °C bis 25 °C.
4. Stellen Sie die UID-PCR-Platte auf die Magnetplatte (Alpaqua) und inkubieren Sie sie 5 Minuten lang.
5. Stellen Sie sicher, dass alle Beads vom Magneten angezogen werden. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand, indem Sie 134  $\mu\text{l}$  pipettieren.

**Hinweis:** Streifen Sie den Ring mit den separierten magnetischen Beads nicht. Bewegen Sie die Pipette bis auf den Boden des Wells, ohne die Wand zu berühren.

6. Transferieren Sie 70%iges EtOH in ein Reservoir (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Benötigtes Volumen an 70%igem EtOH**

Halbe Platte (8 Proben)	Ganze Platte (16 Proben)
13 ml	25 ml

- Geben Sie 100 µl 70%iges EtOH in jedes Well, ohne zu resuspendieren. Inkubieren Sie 30 Sekunden lang.
- Lassen Sie die Platte auf dem Magneten. Entfernen und entsorgen Sie vorsichtig 110 µl EtOH.
- Geben Sie 100 µl 70%iges EtOH in jedes Well, ohne zu resuspendieren. Inkubieren Sie 30 Sekunden lang.
- Lassen Sie die Platte auf dem Magneten. Entfernen Sie vorsichtig 100 µl EtOH und entsorgen Sie es.
- Entfernen Sie verbleibendes EtOH mit der 20-µl-Mehrkanal-Pipette.
- Nehmen Sie die UID-PCR-Platte vom Magneten und lassen Sie sie 2 Minuten lang trocknen.
- Füllen Sie das erforderliche Buffer EB Volumen in ein Reservoir (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Erforderliches Volumen an Buffer EB**

Halbe Platte (8 Proben)	Ganze Platte (16 Proben)
7 ml	13 ml

- Fügen Sie jedem Well 120 µl Buffer EB hinzu, um die DNA zu eluieren, und mischen Sie vorsichtig mindestens 10-mal auf und ab.
- Bestätigen Sie per Sichtprüfung, ob sich alle Beads in Lösung befinden.
- Inkubieren Sie die UID-PCR-Platte mindestens 2 Minuten lang bei 15 °C bis 25 °C.
- Stellen Sie die UID-PCR-Platte auf den Magneten und inkubieren Sie sie 1 Minute lang.
- Übertragen Sie vorsichtig 110 µl des Eluats aus jedem Well in eine neue UID-Eluat-Platte und entsorgen Sie die UID-PCR-Platte.

19. Fahren Sie direkt mit der Index-PCR fort oder verschließen Sie die UID-Eluat-Platte. Lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate lang bei -15 °C bis -30 °C.
20. Wenn mehr als 16 Proben bearbeitet werden, wiederholen Sie das UID-PCR-Aufreinigungsverfahren mit einer zweiten UID-PCR-Platte beginnend bei Schritt 2.

### 9.3 Index-PCR

Eine Index-PCR wird zur Amplifikation aufgereinigter UID-PCR-Produkte und gleichzeitigen Einführung von Indexierungs-Tags (Well-Barcodes) und Illumina Sequenzierungsadaptern durchgeführt.

Jedes Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit enthält eine Index Primer Plate IND34 (Platte A) für bis zu 16 Proben. Wenn mehr als 16 Proben auf einem Sequenzierungslauf analysiert werden, muss eine zweite Index Primer Plate IND35 (Platte B) aus dem Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit verwendet werden.

**Hinweis:** Verwenden Sie nicht dieselbe Index Primer Platte zweimal in einem Sequenzierungslauf. Verwenden Sie immer zwei unterschiedliche Index Primer Platten (IND34 + IND35 / Platte A + Platte B).

Die Wells der Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plates sind für den Einmalgebrauch bestimmt.

Die Positionen der getrockneten Index Primer Plates müssen denen der abschließenden PCR-Platte sowie dem Plattenlayout im Laufplanungstool in der Plasma-SeqSensei™ IVD Software entsprechen (Abbildung 7). Halten Sie fest, welche Wells bereits verwendet wurden. Verwenden Sie bei der Planung des nächsten Laufs die verbleibenden Indexpositionen/Wells und übertragen Sie die Information in die Software.

Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	Sample1					Sample2					NTC
B		Sample3					Sample4					
C		Sample5					Sample6					
D		Sample7					Sample8					
E												
F												
G												
H												

**Abbildung 7: Beispiel-Plattenlayout für Index-PCR**

Benötigte Kits und Reagenzien:

- **Index Primer Plate IND34** (Platte A), Sysmex Inostics, Nr. ZR852004
- *optional: Index Primer Plate IND35* (Platte B), Sysmex Inostics, Nr. ZR852005
- **PCR Master Mix, 2x** (violetter Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR230002
- **Water, nuclease-free** (transparenter/weißer Deckel), Sysmex Inostics, Nr. ZR224006
- **Buffer EB** (Elutionspuffer), QIAGEN, Nr. 19086

**Folgende Schritte werden im Post-PCR-Labor durchgeführt.**

Vorbereitung:

- Stellen Sie alle Reagenzien bereit:
  - Auftauen
  - 5 Sekunden vortexen
  - 2 Sekunden zentrifugieren
- Kennzeichnen Sie alle erforderlichen Kunststoffbehälter (Röhrchen für Index PCR Working Mix, Einmal-Reservoirs, Verdünnungsplatte (DIL-Platte), Index-PCR-Platte).
- Füllen Sie den erforderlichen Buffer EB (Tabelle 15) in ein Reservoir und decken Sie ihn bis zu seiner Verwendung ab.

**Tabelle 15: Erforderliches Volumen an Buffer EB**

Halbe Platte (8 Proben)	Ganze Platte (16 Proben)
5,5 ml	10 ml

- Wenn die Platte bei einer Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C gelagert wurde, führen Sie das PCR-Programm „Remove Condensate\_v1“ aus.
- Wenn die UID-Eluat-Platte gelagert wurde, zentrifugieren Sie sie 5 Sekunden lang bei 1.000 x g.
- Führen Sie bei Verarbeitung von zwei UID-Eluat-Platten immer nur für eine Platte gleichzeitig den Index-PCR-Workflow durch.

#### Vorbereitung der Verdünnungsplatte (DIL-Platte):

**Hinweis:** *Verwenden Sie für alle Schritte der DIL-Plattenvorbereitung eine Mehrkanal-Pipette.*

**Hinweis:** *Wenn die Platte gelagert wurde, mischen Sie jedes Well der UID-Eluat-Platte durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.*

1. Stellen Sie die UID-Eluat-Platte auf den Magneten und inkubieren Sie sie 1 Minute lang.
2. Geben Sie 99 µl Buffer EB pro Well gemäß Plattenlayout in die DIL-Platte.
3. Übertragen Sie 5 µl pro Well von der UID-Eluat-Platte in die DIL-Platte und spülen Sie die Pipettenspitze durch 3-maliges Auf- und Abpipettieren aus.
4. Mischen Sie gründlich, indem Sie 70 µl 10-mal auf- und abpipettieren.
5. Verschließen Sie die UID-Eluat-Platte. Lagern Sie die Platte mit dem verbleibenden Volumen bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate lang bei -15 °C bis -30 °C.

#### Vorbereiten der Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate:

6. Zentrifugieren Sie die Index Primer Plate 5 Sekunden lang bei 1.000 x g.

7. Bereiten Sie die erforderliche Well-Anzahl in der Index Primer Plate vor, indem Sie die Aluminiumfolie mit 200- $\mu$ l-Spitzen durchstechen.

**Hinweis:** Stellen Sie sicher, dass die korrekte Index Primer Platte (IND34 oder IND35 / A oder B) in der korrekten Ausrichtung verwendet wurde.

### Vorbereiten der Index-PCR:

8. Bereiten Sie den Index PCR Working Mix gemäß Tabelle 16 vor. Vortexen Sie den Mix 5 Sekunden lang und zentrifugieren Sie ihn 2 Sekunden lang.

**Tabelle 16: Pipettierschema des Index PCR Working Mix pro Platte**

Anzahl Proben, mit 10 % Überschuss	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix, 2x [ $\mu$ l]	165	234	303	371	440	509	578	646
Water, nuclease-free [ $\mu$ l]	33	47	61	74	88	102	116	129
Endvolumen (Summe)	198	281	364	445	528	611	694	775

Anzahl Proben, mit 10 % Überschuss	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix, 2x [ $\mu$ l]	715	784	853	921	990	1.059	1.128
Water, nuclease-free [ $\mu$ l]	143	157	171	184	198	212	226
Endvolumen (Summe)	858	941	1.024	1.105	1.188	1.271	1.354

**Hinweis:** Das Volumen für eine PC und eine NTC ist bereits enthalten.

9. Geben Sie 15  $\mu$ l Index PCR Working Mix pro Well in die Index Primer Plate.

**Empfehlung:** Übertragen Sie den Working Mix in eine Röhrenkette für den Transfer zur Platte mit einer Mehrkanal-Pipette. Verwenden Sie jedes Mal frische Pipettenspitzen.

10. Geben Sie 10  $\mu$ l Template aus der DIL-Platte in die Index Primer Plate und mischen Sie gründlich durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren, bis die Reagenzien resuspendiert sind. Verwenden

Sie eine Mehrkanal-Pipette. Entsorgen Sie die DIL-Platte nach Gebrauch.

**Hinweis:** Überprüfen Sie die korrekte Ausrichtung der DIL-Platte und der Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate visuell, um eine Verwechslung der Proben zu vermeiden.

**Hinweis:** Prüfen Sie, ob am Boden der Wells nach der Resuspendierung blaue Punkte zu erkennen sind. Ein blauer Punkt weist darauf hin, dass die Reagenzien unzureichend resuspendiert wurden. Wenn die blauen Punkte weiterhin zu sehen sind, wiederholen Sie die Resuspendierung durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren, bis keine blauen Punkte mehr zu sehen sind und die Flüssigkeit gleichmäßig blau gefärbt ist.

11. Verschließen Sie die Index Primer Plate mit PCR-Klebefolie und zentrifugieren Sie sie 5 Sekunden lang bei 1.000 x g.
12. Falls nur ein Teil der Index Primer Plate verwendet wird, transferieren Sie das gesamte Volumen der Index Primer Plate in eine neue PCR-Platte.

**Hinweis:** Überprüfen Sie die korrekte Ausrichtung der Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate und der neuen PCR-Platte, um eine Verwechslung der Proben zu vermeiden.

**Empfehlung:** Verwenden Sie 2x die 20- $\mu$ l-Mehrkanal-Pipette, anstatt 1x die 200- $\mu$ l-Mehrkanal-Pipette zu verwenden.

13. Verschließen Sie die neue PCR-Platte mit PCR-Klebefolie und zentrifugieren Sie sie 5 Sekunden lang bei 1.000 x g.
14. Versiegeln Sie die verwendeten Wells der Index Primer Plate (gilt nur, wenn die Index Primer Plate nicht entsorgt wird) und lagern Sie sie dunkel zwischen 2 °C und 8 °C.
15. Starten Sie die PCR innerhalb von 15 Minuten mit dem Programm „IDX SC\_v1“ (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Zeit-Temperatur-Profil von IDX SC\_v1**

PCR-Cycler: Veriti

Volumeneinstellung: 25 µl

Heizdeckel

Deckeltemperatur:

96 °C

Nr.	T [°C]	Zeit [mm:ss]	Weiter mit Nr.	Anzahl Zyklen
1	98	00:30	n. z.	1
2	98	00:10	n. z.	20
3	65	00:10	n. z.	20
4	72	00:10	2	20
5	72	05:00	n. z.	1
6	4	∞	n. z.	1

16. Wenn mehr als 16 Proben bearbeitet werden, wiederholen Sie das Index-PCR-Verfahren mit einer zweiten UID-Eluat-Platte beginnend bei Schritt 1.
17. Zentrifugieren Sie die Index-PCR-Platten nach der PCR 5 Sekunden lang bei 1.000 x g. Lagern Sie die Platten bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate lang bei -15 °C bis -30 °C oder fahren Sie direkt mit der Index-PCR-Aufreinigung fort.

## 9.4 Index-PCR-Aufreinigung

**Wichtig:** *In diesem Schritt werden **alle Proben- und Kontroll-Wells einer Platte zu einer Bibliothek** kombiniert. Wenn zwei Platten vorbereitet wurden (IND34 und IND35 / Platte A und Platte B), kombinieren Sie nur die Proben und Kontrollen aus **einer Platte**, um zwei Sequenzierungsbibliotheken zu erhalten. Zudem entfernt die Aufreinigung dNTPs, Primer, Primerdimere und Salze, die eine spätere Sequenzierung behindern würden.*

Benötigte Kits und Reagenzien:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, A63881
- **QIAquick® PCR Purification Kit**, QIAGEN, Nr. 28104 oder Nr. 28106
- **Puffer PB**, QIAGEN, Nr. 19066
- **Ethanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.**
- **RNase- and DNase-free distilled water**



**Folgende Schritte werden im Post-PCR-Labor durchgeführt.**

Vorbereitung:

- Wenn die Platte bei einer Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C gelagert wurde, führen Sie das PCR-Programm „Remove Condensate\_v1“ aus.
- Kennzeichnen Sie alle erforderlichen Kunststoffbehälter (EtOH-Verdünnungsröhrchen, PB-Verdünnungsröhrchen, Zentrifugations-säulen, QIAquick® Eluatröhrchen, Index-Eluatröhrchen).
- Bereiten Sie einen Behälter für Flüssigabfall vor.
- Bereiten Sie frisches 70%iges EtOH gemäß Tabelle 18 vor. Invertieren Sie das Ethanol 10-mal.

**Tabelle 18: Vorbereiten von 70%igem EtOH**

Reagenz	Volumen
EtOH ≥ 99,8 %, p.a. [ml]	2,8
Destilliertes Wasser [ml]	1,2
Erforderliches Volumen [ml]	4,0

- Zentrifugieren Sie die Index-PCR-Platte 5 Sekunden lang bei 1.000 x g, bevor Sie den Verschluss öffnen.
- Nehmen Sie die gesamte Flüssigkeit aus **allen Wells (Proben und Kontrollen) einer Platte**, indem Sie mit einer 20- $\mu$ l-Pipette 2 x 15  $\mu$ l in einen geeigneten Behälter übertragen.

**Hinweis:** *Sammeln Sie bei Verwendung einer Mehrkanal-Pipette zunächst alle Wells pro Spalte in eine Reihe einer neuen PCR-Röhrchenkette. Übertragen Sie dann den Inhalt jedes Wells mit einer Einkanal-Pipette in einen geeigneten Behälter.*

- Wenn zwei Index-PCR-Platten verwendet werden sollen, darf die Index-PCR-Aufreinigung immer nur für eine Platte gleichzeitig durchgeführt werden.

**Hinweis:** *Verwenden Sie für die folgenden Schritte in diesem Protokoll eine Einkanal-Pipette.*

### Erste Aufreinigung mit QIAquick®:

1. Beachten Sie für die Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit das Protokoll „QIAquick PCR Purification using a Vacuum Manifold“ im Handbuch des Herstellers. Abweichende Schritte sind nachstehend beschrieben.
2. Geben Sie zunächst das berechnete Volumen (siehe Tabelle 19) von Buffer PB in das entsprechende Röhrchen, vortexen Sie es 3 Sekunden lang und zentrifugieren sie es 2 Sekunden lang bei 500 x g.

**Tabelle 19: Berechnung des erforderlichen Volumens an Buffer PB**

Reagenz	Pro Well	___ x Wells
Probenvolumen [µl]	25	
Buffer PB [µl]	125	
Gesamtvolumen [µl]	150	

3. Führen Sie die folgenden Schritte zur PCR-Aufreinigung gemäß den Anweisungen in QIAGENs Handbuch durch.

**Hinweis:** Das maximale Füllvolumen der Säule beträgt 800 µl. Bei gepoolten Probenvolumina über 800 µl verwenden Sie ein Erweiterungsröhrchen oder befüllen Sie die Säule erneut.

**Hinweis:** Überprüfen Sie bei jedem Schritt visuell, ob das korrekte Volumen in die Säule eingefüllt wurde und die gesamte Flüssigkeit den Filter passiert hat.

**Hinweis:** Beachten Sie bei verstopften Säulen den Leitfaden zur Problembehebung im Handbuch von QIAGEN.

4. Platzieren Sie zur DNA-Elution eine QIAquick® Säule in einem sauberen 1,5 ml LoBind® Röhrchen.
5. Füllen Sie 50 µl Buffer EB in die Mitte der QIAquick® Membran und inkubieren Sie vor dem letzten Zentrifugierungsschritt 1 Minute lang bei 15 °C bis 25 °C.

**Hinweis:** Eluieren Sie nicht zweimal.

Zweite Aufreinigung mit AMPure® Beads:

6. Übertragen Sie 45 µl des Eluats in ein neues LoBind® Röhrchen. Entsorgen Sie das alte Röhrchen.
7. A) Bei Verwendung der ursprünglichen AMPure® Flasche lassen Sie die Beads auf 15 °C bis 25 °C equilibrieren (ca. 30 min) und resuspendieren Sie sie, indem Sie die Flasche horizontal auf der Arbeitsoberfläche rollen. Rollen Sie die Flasche langsam, halten Sie nach einer Drehung um 180 Grad an und warten Sie, bis die Flüssigkeit heruntergelaufen ist. Wiederholen Sie den Vorgang, bis die Beads homogen resuspendiert sind.  
  
B) Bei Verwendung von Aliquots von AMPure® Beads lassen Sie die Beads auf 15 °C bis 25 °C equilibrieren und mischen Sie sie durch mindestens 10-maliges invertieren. Stellen Sie sicher, dass die Beads vollständig resuspendiert sind.
8. Geben Sie 40 µl AMPure® Beads zum Eluat, vortexen Sie 10 Sekunden lang und zentrifugieren Sie 3 Sekunden lang.
9. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei 15 °C bis 25 °C.
10. Öffnen Sie das Röhrchen, platzieren Sie es im DynaMag-2 und inkubieren Sie 2 Minuten lang bei 15 °C bis 25 °C.

Die folgenden Schritte (11 bis 15) werden ausgeführt, während sich die Röhrchen im Magnet-Rack befinden:

11. Verwenden Sie eine auf 100 µl eingestellte 200-µl-Pipette, entfernen und entsorgen Sie den Überstand.  
  
**Hinweis:** *Heben Sie das Röhrchen ~1 cm an und drücken Sie den Boden komplett gegen den Magneten, um sicherzustellen, dass alle Beads fixiert sind.*
12. Geben Sie 500 µl 70%iges EtOH hinzu und inkubieren Sie 30 Sekunden lang bei 15 °C bis 25 °C.
13. Entfernen und entsorgen Sie den Überstand.
14. Geben Sie 500 µl 70%iges EtOH hinzu und inkubieren Sie 30 Sekunden lang bei 15 °C bis 25 °C. Drehen Sie das Röhrchen während der Inkubation 180 Grad um die vertikale Achse, um ein gründliches Mischen zu gewährleisten. Drehen Sie es frühestens nach 5 Sekunden langsam zurück.

15. Entfernen und entsorgen Sie den gesamten Überstand. Entfernen Sie verbleibendes EtOH mit der 20- $\mu$ l-Pipette.
16. Entfernen Sie das Röhrchen aus dem DynaMag-2 und lassen Sie es 2 Minuten lang mit offenem Deckel bei 15 °C bis 25 °C trocknen.
17. Geben Sie 15  $\mu$ l Buffer EB hinzu und resuspendieren Sie die Bead-Mischung vollständig, indem Sie sie 10 Sekunden lang vortexen. Zentrifugieren Sie sie 3 Sekunden lang und inkubieren Sie 1 Minute lang bei 15 °C bis 25 °C.
18. Öffnen Sie das Röhrchen, platzieren Sie es im DynaMag-2 und inkubieren Sie 1 Minute lang bei 15 °C bis 25 °C.
19. Verwenden Sie eine auf 20  $\mu$ l eingestellte 20- $\mu$ l-Pipette, um den gesamten Überstand in das Röhrchen „Index-Eluat“ zu übertragen.  
**Hinweis:** *Heben Sie das Röhrchen ~1 cm an und drücken Sie den Boden komplett gegen den Magneten, um sicherzustellen, dass alle Beads fixiert sind.*
20. Entsorgen Sie das mit „QIAquick® Eluat“ gekennzeichnete Röhrchen.
21. Lagern Sie das Röhrchen „Index-Eluat“ bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate lang bei -15 °C bis -30 °C oder fahren Sie direkt mit der Quantifizierung im Bioanalyzer fort.
22. Wenn mehr als 16 Proben bearbeitet werden, wiederholen Sie das Index-PCR-Aufreinigungsverfahren mit einer zweiten Index-PCR-Platte beginnend bei Schritt 2.

### 9.5 Bibliotheks-Qualitätskontrolle (Bioanalyzer)

Die Bibliotheks-Qualitätskontrolle wird mithilfe eines Bioanalyzers durchgeführt, um jede Bibliothek auf Nebenprodukte zu prüfen und die Durchschnittsgröße zu bestimmen. Die Quantifizierung muss für jede Bibliothek in drei Replikaten durchgeführt werden.

Das Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit wurde unter Verwendung des Bioanalyzer DNA 1000 Kit von Agilent entwickelt.

Benötigte Kits und Reagenzien:

- **DNA 1000 Kit**, Agilent, Nr. 5067-1504
- **Buffer EB** (Elutionspuffer), QIAGEN, Nr. 19086
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Folgende Schritte werden im Post-PCR-Labor durchgeführt.

#### Vorbereiten des Bioanalyzers:

Lassen Sie alle Reagenzien im Dunkeln 30 min lang auf 15 °C bis 25 °C equilibrieren.

Beachten Sie bei allen Schritten das Handbuch für den Agilent Bioanalyzer.

**Hinweis:** Die Probenmessung muss in drei technischen Replikaten durchgeführt werden.

Vorbereiten der Bioanalyzer-Verdünnung (BA\_DIL):

1. Berechnen Sie die **erforderlichen Volumina für BA\_DIL**:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{DNA-Input insgesamt}}{86}$$

mit DNA-Input insgesamt aus allen analysierten Proben in ng/116 µl + 4.3 ng für jede Positive Control (PC).

(gemessen mit Qubit™, siehe ► Kapitel 4.3 Probenquantifizierung (Qubit™) im Leitfaden zur Probenvorbereitung)

**Hinweis:** Falls der Verdünnungsfaktor < 1 ist, verdünnen Sie Ihr Index-Eluat nicht, sondern verwenden Sie es direkt für die QC-Messung, die Quantifizierung und die 2-nM-Verdünnung.

$$\text{Buffer EB } [\mu\text{l}] = (3 * \text{Verdünnungsfaktor}) - 3 \mu\text{l}$$

$$\text{BA\_DIL } [\mu\text{l}] = 3 \mu\text{l Index - Eluat} + X \mu\text{l Buffer EB}$$

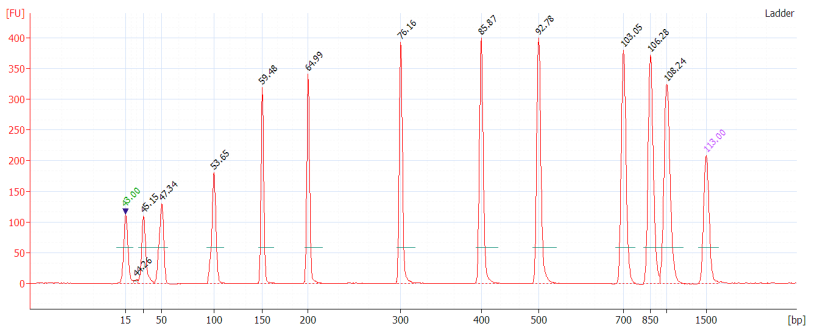
2. Verdünnen Sie das Index-Eluat gemäß Berechnung in einem frischen Röhrchen. Vortexen Sie es kurz und zentrifugieren Sie es 3 Sekunden lang. Lagern Sie das verbleibende Index-Eluat bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate lang bei -15 °C bis -30 °C.

**Hinweis:** Es müssen mindestens 10 µl Gesamtvolumen an BA\_DIL verfügbar sein.

**Hinweis:** BA\_DIL ist bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate lang bei -15 °C bis -30 °C stabil.

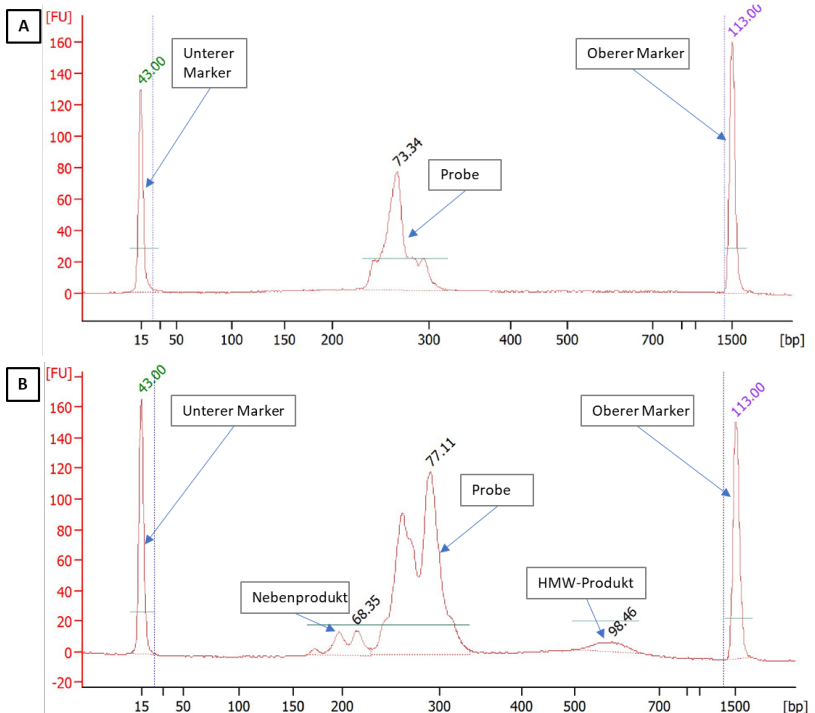
### Datenanalyse:

3. Überprüfen Sie, ob das Profil [Ladder Plot] (Leiterdiagramm) ähnlich aussieht wie unten in Abbildung 8 und 13 Spitzen umfasst, von der die niedrigste bei 15 bp und die höchste bei 1.500 bp liegt (diese Marker sind in jedem Probe-Read enthalten); die Grundlinie muss flach sein (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Leiter-Elektropherogramm (Bioanalyzer)**


4. Doppelklicken Sie auf das Elektropherogramm zu Well 1 und wählen Sie die Registerkarte [Peak Table] (Spizentabelle) (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Elektropherogramme von Proben auf einem Bioanalyser. (A) Ein optimales Elektropherogramm ohne Nebenprodukte, (B) Beispiel-Elektropherogramm mit Nebenprodukten (z. B. Primerdimer und gDNA (HMW-Produkt)).**

5. Wählen Sie [Manual Integration] (Manuelle Integration) durch Rechtsklick im Elektropherogramm.
6. Verwenden Sie die blauen Linien, um **alle visuellen Spitzen**, im Einzelnen Probenprodukt, Primerdimer (Nebenprodukt) und Produkt mit hohem Molekulargewicht (High Molecular Weight, HMW) **entlang der Nulllinie** abzugrenzen (in Abbildung 9B dargestellt).

**Hinweis:** Verwenden Sie die „Strg“-Taste, um die Enden der blauen Linien von der roten Linie zu lösen. Entfernen Sie eine ausgewählte Linie, indem Sie rechtsklicken und [Remove Peak] (Spitze entfernen) auswählen. Fügen Sie zusätzliche blaue Linien in beliebiger Position ein, indem Sie rechtsklicken und [Add Peak] (Spitze hinzufügen) auswählen.

7. Verwenden Sie [Peak Description] (Spitzenbeschreibung) () und wählen Sie [Peak Molarity] (Molarität der Spitze), um die entsprechende Molarität jeder Spitze anzuzeigen.
8. Speichern Sie die Datei.
9. Wiederholen Sie die Schritte 4 bis 8 für die verbleibenden Wells jedes Replikats.
10. Berechnen Sie den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten (Coefficient of Variation, CV) der Gesamtmolarität aller Produkte basierend auf der dreifachen Messung.

Akzeptanz- und Ausschlusskriterien:

- DNA-Qualitätsprüfung: wenn die Summe aus Produkt, Primerdimer und HMW < 2,0 nmol/l beträgt, ist die DNA-Konzentration zu niedrig für die Sequenzierung.
- Akzeptanzkriterium Rauschabstand (Signal-to-Noise Ratio, SNR):  $\geq 90 \%$

$$SNR [\%] = \frac{\text{Molarität eines spezifischen Produkts}}{\text{Summe aus spezifischem, Neben- und HMW-Produkt}} * 100$$

- Akzeptanzkriterium Genauigkeitsprüfung: CV der Gesamtmolarität aller Produkte  $\leq 10 \%$

$$\text{Variationskoeffizient} [\%] = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} * 100$$

**Hinweis:** Bestimmen Sie die Standardabweichung auf Basis einer Probe.

**Hinweis:** Wenn der Rauschabstand aufgrund einer unspezifischen Spitze die jeweiligen Kriterien nicht erfüllt, kann dieser Wert von den Berechnungen ausgeschlossen werden.



**Hinweis:** Falls der CV der Triplikate > 10 % ist, kann der niedrigste Wert aus den Probenberechnungen entfernt werden, sofern die anderen beiden Werte dann die Akzeptanzkriterien erfüllen.

**Hinweis:** Wenn ein oder mehrere Kriterien nicht erfüllt werden, bereiten Sie eine neue BA\_DIL vor und wiederholen Sie den Bioanalyser-Lauf.

## 9.6 Sequenzierung auf dem Illumina NextSeq™ 500/550

Die Sequenzierung der Bibliotheken erfolgt mit einem Illumina NextSeq™ 500 oder 550 gemäß der Beschreibung in der Gebrauchsanweisung von Illumina.

Benötigte Kits und Reagenzien:

- **NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Zyklen)**, Illumina, Nr. 20024904  
≤ 590 ng DNA-Input insgesamt (basierend auf Messung mit Qubit™  
▶ Kapitel 4.3 *Probenquantifizierung (Qubit™)* im Leitfaden zur Probenvorbereitung) ODER
- **NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Zyklen)**, Illumina, Nr. 20024907  
≤ 2.038 ng DNA-Input insgesamt (basierend auf Messung mit Qubit™  
▶ Kapitel 4.3 *Probenquantifizierung (Qubit™)* im Leitfaden zur Probenvorbereitung)
- **Natriumhydroxid (NaOH)**, 1 M
- **Trizma® Hydrochloridlösung pH 7,0**, 1 M
- **Buffer EB** (Elutionspuffer), QIAGEN, Nr. 19086
- **RNase- and DNase-free distilled water**

Folgende Schritte werden im Post-PCR-Labor durchgeführt.

Vorbereiten der Proben (2-nM-Startbibliothekskonzentration) für die Sequenzierung:

1. Berechnen Sie das erforderliche Gesamtvolumen jeder 2-nM-Bibliothek:

$$\begin{aligned} \text{Gesamtvolumen} [\mu\text{L}] &= \frac{3 \mu\text{L BA\_DIL} * \text{Konzentration}_{\text{Bibliothek in nM}}}{2 \text{ nM}} \end{aligned}$$

2. Berechnen Sie das erforderliche **Volumen an Buffer EB**:

$$\text{Volumen}_{\text{Buffer EB}} [\mu\text{L}] = \text{Gesamtvolumen} - 3 \mu\text{L BA\_DIL}$$

3. Bereiten Sie für jede Bibliothek eine 2-nM-Bibliotheksverdünnung gemäß folgender Berechnung vor:

$$\begin{aligned} \text{2 - nM - Bibliotheksverdünnung} &= 3 \mu\text{L BA\_DIL} + \text{Volumen}_{\text{Buffer EB}} \end{aligned}$$

**Hinweis:** Pipettieren Sie keine Mengen  $< 3 \mu\text{L}$ .

**Hinweis:** Wenn das Volumen der 2-nM-Verdünnung  $< 10 \mu\text{L}$  beträgt, passen Sie das Gesamtvolumen an.

4. *Optional:* Wenn zwei Platten mit dem Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit verarbeitet wurden, fügen Sie die beiden getrennten 2-nM-Bibliotheksverdünnungen gemäß den folgenden Gleichungen zu einem abschließenden Library Pool Mix von  $10 \mu\text{L}$  zusammen:

$$\text{DNA - Input}_{\text{insgesamt}} = \sum \text{DNA - Input}_{\text{platteA}} + \sum \text{DNA - Input}_{\text{platteB}}$$

$$\text{Volumen}_{\text{platteA}} = \frac{10 \mu\text{L}}{\text{DNA - Input}_{\text{insgesamt}}} * \text{DNA - Input}_{\text{platteA}}$$

$$\text{Volumen}_{\text{platteB}} = \frac{10 \mu\text{L}}{\text{DNA - Input}_{\text{insgesamt}}} * \text{DNA - Input}_{\text{platteB}}$$

**Hinweis:** *Pipettieren Sie nur Volumina innerhalb der zulässigen Bereiche der verfügbaren Pipetten. Wenn geringere Volumina pipettiert werden sollen, erhöhen Sie stattdessen das Gesamtvolumen des abschließenden Library Pool Mix.*

- Führen Sie eine Denaturierung der (gepoolten) Bibliotheken mit frisch vorbereiteter 0,2 M NaOH durch (siehe Tabelle 20). Vortexen Sie 5 Sekunden lang und zentrifugieren Sie 3 Sekunden lang.

**Tabelle 20: Erforderliche Volumina für die Denaturierung und Verdünnung von Bibliotheken**

Bibliothek	0,2 M NaOH	0,2 M Tris-HCl	HT1 Puffer
10 µl	10 µl	10 µl	970 µl

- Inkubieren Sie die (gepoolte) Bibliothek 5 min bei 15 °C bis 25 °C.
- Fügen Sie zu der denaturierten (gepoolten) Bibliothek 10 µl von 0,2 M Tris-HCl, pH 7,0, hinzu (siehe Tabelle 20). Vortexen Sie 5 Sekunden lang und zentrifugieren Sie 3 Sekunden lang.
- Verdünnen Sie die denaturierte (gepoolte) Bibliothek auf 20 pM, indem Sie 970 µl vorgekühlten HT1-Puffer hinzufügen (liegt dem Illumina Sequenzierungskit bei, siehe Tabelle 20). Vortexen Sie 5 Sekunden lang und zentrifugieren Sie 3 Sekunden lang.
- Verdünnen Sie die denaturierte (gepoolte) 20-pM-Bibliothek mit dem HT1-Puffer in einem frischen Röhrchen auf die optimale, finale Ladekonzentration, die dem ausgewählten Sequenzierungskit und Sequenzierungsgerät entsprechen muss (siehe Tabelle 21). Vortexen Sie 5 Sekunden lang und zentrifugieren Sie 3 Sekunden lang.

**Wichtig:** *Die optimale, finale Ladekonzentration kann für jedes Sequenzierungsgerät anders sein und muss vom Benutzer ermittelt werden. Beginnen Sie zunächst mit der von uns empfohlenen finalen Ladekonzentration, die in Tabelle 21 angegeben ist. Steigern Sie die Ladekonzentration, falls die Clusterdichte gering ausfällt. Senken Sie die Ladekonzentration, falls die Clusterdichte in den Läufen zu hoch ist.*

**Tabelle 21: Erforderliche Volumina für die empfohlene finale Ladekonzentration zur Sequenzierung**

	Mid Output Kit	High Output Kit
<b>Empfohlene finale Konzentration</b>	1,0 pM	1,1 pM
<b>Bibliothekszugabe</b>	65 µl	71 µl
<b>HT1-Puffer</b>	1.235 µl	1.229 µl

- Starten Sie den Sequenzierungslauf mit NextSeq Control, falls eine separate Demultiplexierungs-Pipeline an der Sequenzierungsstelle zum Einsatz kommt (z. B. bcl2fastq von Illumina). Ansonsten starten Sie den Sequenzierungslauf mit dem Local Run Manager des NextSeq Geräts.
- Führen Sie den Start des Sequenzierungslauf gemäß dem Protokoll von Illumina (NextSeq™ 550 Systemhandbuch, Dokument Nr. 15069765v06) mit folgenden „Run Parameter Settings“ in Tabelle 22 durch:

**Tabelle 22: Sequenzierungsparameter**

<b>Read-Typ</b>	Single Read		
	<b>Read 1</b>	<b>Index 1</b>	<b>Index 2*</b>
<b>Read-Länge</b>	148	10	10

\* Die Read-Länge von Index 2 wird nur verwendet, wenn zwei Platten im selben Sequenzierungslauf genutzt werden.

- Geben Sie bei Verwendung vom Local Run Manager folgende Adaptereinstellungen in Tabelle 23 (können vom Probenblatt kopiert werden) unter „Advanced Module Settings“ ein:

**Tabelle 23: Adaptereinstellungen für den Local Run Manager**

Bezeichnung	Sequenz
Adapter	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA

**Wichtig:** Die Clusterdichte darf den Wert von 220 K/mm<sup>2</sup> nicht überschreiten. Falls die Clusterdichte > 220 K/mm<sup>2</sup> ist, wiederholen Sie den Sequenzierungslauf mit einer geringeren Ladekonzentration. Für die Clusterdichte wird ein Bereich von 150 – 220 K/mm<sup>2</sup> empfohlen.

### **Nächste Schritte**

Beachten Sie die Gebrauchsanweisung für die Plasma-SeqSensei™ IVD Software (Datenanalysemodul), um mit der Analyse der Sequenzierungsdaten fortzufahren.

### 10 Technische Unterstützung

Bei Problemen während des Workflows des Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kits wenden Sie sich bitte an Ihren Sysmex Kundendienst vor Ort, um Unterstützung zu erhalten.



**Hinweis:** *Der Leitfaden zur Probenvorbereitung und die Gebrauchsanweisung für das Plasma-SeqSensei™ IVD Assay sowie für die Plasma-SeqSensei™ IVD Software sind online unter folgendem Link in verschiedenen Sprachen abrufbar <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/>.*

## 11 Leistungsmerkmale

### 11.1 Analytische Sensitivität

Die Evaluation der Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) wurde gemäß den Spezifikationen der Richtlinie *CLSI EP17-A2* durchgeführt.

Die Analyse umfasste Insertionen, Deletionen, Substitutionen und Deletionen-Insertionen.

Der von der LoD abgeleitete Cutoff-Wert liegt bei 7 mutierten Molekülen (MM).

Analyt (MM)	Trefferrate in % (n=108)	LoD95
20	100	6,21 MM (95%-KI 5,47 – 7,26 MM)
10	99,3	
5	91,1	
2,5	70,4	
1,25	47,7	

### 11.2 Analytische Spezifität

Das Produkt wurde in-silico unter Verwendung einer BLAST-Analyse auf mögliche Kreuzreaktivität geprüft und seine hohe Spezifität bestätigt. Sequenzen außerhalb des Zielbereichs umfassen das Humangenom sowie öffentlich verfügbare DNA-Sequenzen typischer durch Blut übertragener Mikroorganismen/Viren wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, HIV und Hepatitis-C-Virus.

### 11.3 Präzision/Wiederholbarkeit

Die Evaluation der Präzision wurde gemäß den Spezifikationen der Richtlinie *CLSI EP05-A3* durchgeführt.

Die qualitative Präzision beträgt > 99 %.

## 11 Leistungsmerkmale

---

Die quantitative Wiederholbarkeit beträgt  $< 10\%$  (max. CV) und die Laborpräzision beträgt  $< 36\%$  bei  $\geq 20$  MM.

Ziel MM	Wiederholbarkeit (max. CV in %)	Laborpräzision
500	1,63	22,32
100	3,34	25,50
50	5,01	28,97
20	6,51	35,21

### 11.4 Messbereich/Linearität

Die Bestimmung des linearen Bereichs für den DNA-Input wurde gemäß den Spezifikationen der Richtlinie *CLSI EP06-A* durchgeführt.

Der Plasma-SeqSensei™ Workflow ist innerhalb des DNA-Inputbereichs des Assays linear (5,7 – 95 ng pro Probe).

### 11.5 Störsubstanzen

Die Ermittlung von Störsubstanzen wurde gemäß den Spezifikationen der Richtlinie *CLSI EP07-A2* durchgeführt.

Die Robustheit des Plasma-SeqSensei™ Workflows gegen häufige Störsubstanzen wurde bestätigt. Das Vorliegen von Hämoglobin ( $\leq 2$  g/l), Bilirubin ( $\leq 200$  mg/l), Triglyceriden ( $\leq 15$  g/l), Melanin ( $\leq 0,2$  µg/l) und Ethanol ( $\leq 86,8$  mmol/l) hat keinen Einfluss auf die Validität und Ergebnisse des Tests.

### 11.6 Klinische Leistungen und Eigenschaften

Die klinische Leistung des Plasma-SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kits wurde ermittelt, indem für alle Zielgene 115 positive und 109 negative Proben getestet wurden. Die Sensitivität beträgt  $87\%$  (95 %-CI:  $79,6\% - 91,9\%$ ) und die Spezifität beträgt  $98\%$  (95 %-CI:  $93,6\% - 99,5\%$ ).



		Referenzmethode: OncoBEAM™ IVD Kit, Cobas® EGFR IVD Kit		
		positiv	negativ	gesamt
Plasma- SeqSensei™ Solid Cancer IVD Kit	positiv	100	2	102
	negativ	15	107	122
	gesamt	115	109	224

Die prozentuale Übereinstimmung beträgt insgesamt 92,4 %.

### 11.7 Einschränkungen

Leistungsdaten für Proben an der Grenze des zulässigen DNA-Input-Bereichs können von den angegebenen Werten abweichen und bei Proben mit geringerer Konzentration zu einer geringeren Präzision und Wiederholbarkeit führen. Bei Proben mit höheren Konzentrationen kann es zu geringeren LoD-Werten führen.

## 12 Glossar und Begriffe

Begriff	Definition
bp	Basenpaar
BA_Dil	Bioanalyzer-Verdünnung
BLAST	grundlegendes Suche-Tool für lokales Alignment
cfDNA	zellfreie DNA
CI	Konfidenzintervall
CLSI	Institut für klinische und Labornormen
COSMIC	Katalog somatischer Mutationen bei Krebs
ctDNA	zirkulierende Tumor-DNA
CV	Variationskoeffizient
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EtOH	Ethanol
gDNA	genomische DNA
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus
HMW	hohes Molekulargewicht
IDX	Index
IFU	Gebrauchsanweisung
LoD	Nachweisgrenze

Begriff	Definition
MAF	mutierte Allelfraktion
MM	mutierte Moleküle
Mpx	Multiplex Primer Mix
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Next-Generation-Sequenzierung
NTC	No Template Control
PC	Positive Control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QC	Qualitätskontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
SNV	Einzelnukleotidvariante
UID	eindeutige Kennung

### 13 Literatur

- 1) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 2) Lee T, Clarke JM, Jain D, Ramalingam S, Vashistha V. Precision treatment for metastatic non-small cell lung cancer: A conceptual overview. *Cleve Clin J Med.* 2021 Feb 1;88(2):117-127. doi: 10.3949/ccjm.88a.19148. PMID: 33526466.
- 3) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949-54. doi: 10.1038/nature00766. Epub 2002 Jun 9. PMID: 12068308.
- 4) Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, Kaplan R, Quirke P, Seymour MT, Richman SD, Meijer GA, Ylstra B, Heideman DA, de Haan AF, Punt CJ, Koopman M. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 15;20(20):5322-30. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0332. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25139339; PMCID: PMC4201568.
- 5) Gonzalez D, Fearfield L, Nathan P, Tanière P, Wallace A, Brown E, Harwood C, Marsden J, Whittaker S. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel. *Br J Dermatol.* 2013 Apr;168(4):700-7. doi: 10.1111/bjd.12248. PMID: 23360189.
- 6) Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Mar 13;11:102. doi: 10.3389/fendo.2020.00102. PMID: 32231639; PMCID: PMC7082927.
- 7) Kerr K. EGFR in Lung Cancer: ESMO Biomarker Factsheet 2015.
- 8) Veluswamy R, Mack PC, Houldsworth J, Elkhoully E, Hirsch FR. KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Biology, Developmental Therapeutics, and Molecular Testing. *J Mol Diagn.* 2021 May;23(5):507-520. doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.02.002. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33618059.
- 9) Troiani T. RAS in Colorectal Cancer. ESMO Biomarker Factsheet 2015.
- 10) Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature.* 1987 May 28-Jun 3;327(6120):293-7. doi: 10.1038/327293a0. PMID: 3587348.
- 11) Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, Hayward R, Lambros M, Reis-Filho JS, Marais R. A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5549-57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4254. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20516123; PMCID: PMC2896549

- 12) Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23000897; PMCID: PMC3465532.
- 13) Wang Y, Wang Y, Li J, Li J, Che G. Clinical Significance of PIK3CA Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2020 Aug 17;2020:3608241. doi: 10.1155/2020/3608241. PMID: 32908885; PMCID: PMC7450343.
- 14) Wang Q, Shi YL, Zhou K, Wang LL, Yan ZX, Liu YL, Xu LL, Zhao SW, Chu HL, Shi TT, Ma QH, Bi J. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2018 Jul 3;9(7):739. doi: 10.1038/s41419-018-0776-6. PMID: 29970892; PMCID: PMC6030128.
- 15) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.
- 16) Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 2019 Mar 18;17:100087. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087. PMID: 30923679; PMCID: PMC6425120.
- 17) Fiste O, Liontos M, Koutsoukos K, Terpos E, Dimopoulos MA, Zagouri F. Circulating tumor DNA-based predictive biomarkers in breast cancer clinical trials: a narrative review. *Ann Transl Med*. 2020 Dec;8(23):1603. doi: 10.21037/atm-20-1175. PMID: 33437802; PMCID: PMC7791253.
- 18) [Online] <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- 19) Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, Bittner AK, Kimmig R, Hahn P, Kasimir-Bauer S. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Feb;77(3):497-509. doi: 10.1007/s00018-019-03189-z. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31254045; PMCID: PMC7010653.
- 20) Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, Howarth K, Epstein M, Green E, Rosenfeld N, Ring A, Johnston S, Turner N. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018 Jan 1;29(1):145-153. doi: 10.1093/annonc/mdx483. PMID: 29045530; PMCID: PMC6264798.

### 14 Urheber- und Markenrechte

Die teilweise oder vollständige Vervielfältigung des Inhalts dieses Handbuchs erfordert die vorherige schriftliche Genehmigung durch die Sysmex Corporation, Japan.

Plasma-SeqSensei™ ist eine Marke der Sysmex Corporation, Japan.

Alle anderen Marken, Namen und Produkte, selbst wenn sie nicht spezifisch gekennzeichnet sind, sind Marken oder eingetragene Marken ihrer jeweiligen Eigentümer.

## 15 Revisionsverlauf

Dokument Version	Datum	Änderungsbeschreibung	Abschnitt
R3	Dezember 2023	Aktualisierung der Hinweise zu SNR und CV bei Bioanalyzer-Verwendung	9.5
R2	November 2023	Aktualisierung der Erfassungsgrenzwerte für Keimbahnmutationen	6
		Informationen zu Berichten über unvollständige Abdeckung von aminosäure-verschlüsselnde Nukleotid-Triplets	6
		Senkung der oberen Labortemperaturgrenze und Spezifizierung der Raumtemperatur (15 °C bis 25 °C)	8.2 9
		Aktualisierung des Downloadlinks für Gebrauchsanweisungen und Material-Sicherheitsdatenblätter	8.3 10
		Zusatz der Mindestprobenzahl pro High Output Kit	9
		Aktualisierung der Empfehlung zur Probenverdünnung und Quantifizierung mit Qubit™	9.1
		Informationen zum Umgang mit AMPure magnetischen Beads	9.2 9.2 Schritt 15 9.4 Schritt 7
		Zusatz von erweiterten Informationen zur Probedenaturierung, Verdünnung und Sequenzierungseinleitung	9.6 Schritte 5 - 12
		Zusatz von Informationen zur Leistungscharakterisierung	11
		Erweiterung der Tabelle des Revisionsverlaufs Kleinere Korrekturen, Rechtschreibung, Layout und Änderungen der Reihenfolge	15
R1	Juni 2022	n.z.	



Dezember 2023  
ZR150537.R3

Sysmex Inostics GmbH  
Falkenried 88  
20251 Hamburg,  
Deutschland  
[www.sysmex-inostics.com](http://www.sysmex-inostics.com)



© 2023 Sysmex Inostics  
Alle Rechte vorbehalten.