NorPreM

Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin

# Nasjonale anbefalinger av preanalytiske faktorer og ekstraksjon fra FFPE-materiale til bruk i NGS-analyser

Annette Knapskog Alte, Akershus universitetsykehus HF
Jon Andreas Lorentzen, Helse Stavanger HF
Kristin Dahl – Michelsen, Helse Bergen HF
Rita Slettebø, Helse Bergen HF
Hong Yan Dai, St. Olavs hospital HF

H2023 – V2025

Sammendrag ..... 2
Oppsummering av anbefalinger ..... 2
1. Bakgrunn for prosjektet ..... 3
1.1 Hensikt med prosjektet ..... 3
2. Om prosjektet ..... 4
2.1 Avgrensninger med prosjektet ..... 4
2.2 Resultatmål ..... 4
2.3 Effektmål ..... 4
2.4 Organisering av prosjektet ..... 4
2.5 Fremdrifts- og milepælsplan ..... 5
3. Resultat av kartlegging ..... 6
3.1 Oppsummering del 1: Preanalytiske betingelser ..... 6
3.2 Oppsummering del 2: Kvalitetsindikatorer ved valg av tumormateriale til ekstraksjon ..... 6
3.3 Oppsummering del 3: Kvalitetskriterier ved ekstraksjon av DNA/RNA ..... 7
3.4 Oppsummering del 4: Betraktning av kvalitet på DNA/RNA ved analyse og tolkning av NGS ..... 7
4. Anbefaling ..... 8
Del 1: Preanalytiske betingelser ..... 8
Del 2: Vurdering og utvelgelse av prøvemateriale ..... 10
Del 3: Ekstraksjonskriterier ..... 13
Del 4: Kvalitetsmål ..... 15
Konklusjon og fremtidige behov ..... 18
Referanseliste ..... 18
Vedlegg ..... 20
Vedlegg 1: Prosjektdeltakere ..... 21
Vedlegg 2: Fremdrifts- og milepælsplan ..... 21
Vedlegg 3: Spørreskjema ..... 23
Vedlegg 4: Begrepsbibliotek ..... 25
Vedlegg 5: Oversikt over ekstraksjonskit ..... 26
Vedlegg 6: Kvalitetsparametere for vurdering av en sekvensering ..... 27
Vedlegg 7: Resultat av spørreskjema ..... 27

# Sammendrag

Neste generasjons sekvensering (NGS) er en avgjørende analysemetode for å oppdage genetiske avvik innen persontilpasset kreftbehandling. DNA og RNA isolert fra formalin-fiksert parafininnstøpt (FFPE) tumorvev utgjør hovedmengden av prøvemateriale. For å harmonisere persontilpasset kreftbehandling i Norge, er like egnethetskriterier for DNA/RNA avgjørende. Store ulikheter i egnethetskriterier kan føre til at samme tumorprøve kan anses som egnet til NGS-analyse i ett laboratorium, men betraktes som uegnet i et annet.

Målet med prosjektet var å skape en felles forståelse og enighet blant laboratoriene i Norge for kriteriene av egnethet til DNA/RNA isolert fra FFPE-materiale. Prosjektet omfatter kartlegging av dagens praksis innen preanalytiske betingelser ved tumorvev, DNA/RNA-isolering, kvantitering og kvalitetssikring av prøvematerialet som brukes til NGS-analyser.

For å sikre kvalitet i molekylære analyser anbefales styrket samarbeid mellom patologi og molekylærpatologi, samt standardiserte prosedyrer og sporbarhet ved fremstilling av FFPE-materiale. Nye metoder hos patologiavdelingene bør testes for effekt på DNA/RNA-kvalitet før implementering. Automatiserte ekstraksjonsmetoder og fluorometrisk kvantitering øker reproduserbarheten. Ved lav kvalitet og/eller lav tumorandel bør resultatet vurderes kritisk.

Basert på resultatene fra en nasjonal spørreundersøkelse og litteratursøk, har prosjektgruppen levert anbefalinger og kommet med en oppfordring om å jevnlig gjennomgå eksisterende anbefalinger for å følge den raske utviklingen som molekylærpatologi står i. En fullstendig harmonisering er vanskelig å oppnå ettersom det er mange ulikheter mellom laboratoriene og det er ulike betingelser for hvilke NGS-analyser som benyttes.

*Oppsummering av anbefalinger*

| Kategori | Anbefaling |
|---|---|
| Standardisering og sporbarhet | Standardiserte prosedyrer for FFPE-materiale og økt sporbarhet i prosessene. |
| Implementering av nye prosedyrer | Før implementering av nye prosedyrer på patologiavdelingen bør effektiv på DNA/RNA testes. |
| Kommunikasjon og arbeidsflyt | God kommunikasjon mellom patologi og molekylærpatologi for effektiv arbeidsflyt. |
| Kompetanse og nasjonale krav | Etablere standardiserte kompetanse og nasjonale krav for vurdering av materiale. |

| | |
|---|---|
| Opplæring og kvalitetssikring | Rutiner for opplæring, kus og deltakelse i eksterne kvalitetsprogrammer. |
| Kvantitering og kvalitetstesting | Bruk av fluorometer for kvantitering og tester for fragmenteringsgrad. |
| Bevisstgjøring ved utfordrende prøver | Anbefalinger ved lav DNA/RNA-konsentrasjon, fragmentert materiale og lav tumorandel. |
| Dokumentasjon i svarrapport | Inkludere vurdert tumorandel og patologisk beskrivelse i svarrapport. |

# 1. Bakgrunn for prosjektet

I Norge benyttes ulike leverandører for NGS-analyse i kreftdiagnostikk. Kvalitet på DNA/RNA avhenger av flere faktorer ved behandling av FFPE pasientmateriale, f.eks.; fikseringstid på formalin, utvalg og uttak av tumormateriale fra FFPE. Dette regnes som egnethetskriterier for DNA/RNA. **Ulikeegnethetskriterier ved FFPE-materiale vil medføre at man kan risikere at samme tumorprøve kan ansees som egnet til NGS analyse i et laboratorium, men betraktes som uegnet i et annet**.

I kommersielle NGS-protokoller er det ofte et minimumskrav for DNA/RNA input i nanogram (ng) for NGS bibliotekspreparering. Ved sparsomt tumorvev er det ikke alltid disse kravene oppfylles. Enkelte laboratorier setter likevel opp NGS-analyser med mindre DNA/RNA input enn anbefalt. Feil håndtering av prøver kan medføre forsinket og forringet diagnose, noe som kan føre til rapporteringer av feil prøvesvar. Det er derfor behov for en gjennomgang av dagens praksis og utvikling av en felles forståelse for egnethetskriterier. Ved å bruke hverandres erfaring kan vi effektivisere NGS-analysene ved å øke forståelsen for de ulike egnethetskriteriene, og dermed vite hva man må ta hensyn til ved oppstart av NGS og/eller feilsøking ved mislykkede analyser. **Felles forståelse for egnethetskriterier vil være både pasientnyttig og lede til bedre arbeidsflyt for NGS ved norske helseforetak.**

## 1.1 Hensikt med prosjektet

Hensikten med prosjektet var å sikre lik forståelse av kvalitetsindikatorer for DNA/RNA benyttet i rutinediagnostikk for molekylær analyse, og dermed sikre likeverdig tilbud for pasienten. En slik harmonisering er i tråd med NorPreM sitt formål om å styrke det nasjonale samarbeidet for å sikre enhetlig og effektiv implementering av persontilpasset medisin i helsetjenesten i Norge (1).

# 2. Om prosjektet

For å kartlegge dagens rutiner ble det utarbeidet et spørreskjema (vedlegg 3) som ble sendt til alle helseforetak som utfører NGS-analyser på FFPE-materiale. Undersøkelsen ble besvart av 15 representanter på vegne av 12 sykehus i Norge.

Spørreundersøkelsen var inndelt i fire deler og omhandlet følgende tema:

1. Preanalytiske betingelser.
2. Kvalitetsindikatorer ved valg av tumormateriale til ekstraksjon.
3. Kvalitetskriterier ved ekstraksjon av DNA/RNA.
4. Betraktning av kvalitet på DNA/RNA ved analyse og tolking av NGS.

## 2.1 Avgrensninger med prosjektet

Prosjektet begrenser seg til en felles utarbeidet spørreundersøkelse som ble besvart av deltakere i alle helseregionene i Norge. Resultatet fra undersøkelsen ble sammenfattet, og dette ble utgangspunkt for diskusjon og utforming av nasjonale retningslinjer for forbehandling og ekstraksjon av FFPE-materiale til NGS-analyser. I tillegg til erfaringsbasert praksis er det gjort litteratursøk for å underbygge der det er gitt spesifikke retningslinjer.

Enkelte punkt fra spørreundersøkelsen pkt. 4, som omhandler parametere for kvalitetskontroll (QC) per prøve, blir ikke kommentert videre da dette dekkes av andre prosjektgrupper i NorPreM (2).

## 2.2 Resultatmål

1. Opprette en nasjonal arbeidsgruppe.
2. Utforme et spørreskjema som kartlegger rutinepraksis relatert til DNA/RNA isolering og kvantisering og kvalitetskontroll.
3. Tre fysiske heldagsmøter for prosjektgruppen der erfaringer og konkrete eksempler fra rutine utveksles.
4. Anbefalinger og tiltak basert på erfaring og faglitteratur.
5. Sende rapporten på høringsrunde til alle patologiavdelinger i landet.

## 2.3 Effektmål

Prosjektet ønsket å oppnå følgende leveranser:

1. Lik bruk av metode for kvalitet- og kvantitetskontroll av DNA/RNA, spesielt når det er sparsomt med tumorvev i pasientmateriale.
2. Felles forståelse, oppfatning og praktisering av egnethetskriterier av DNA/RNA.

## 2.4 Organisering av prosjektet

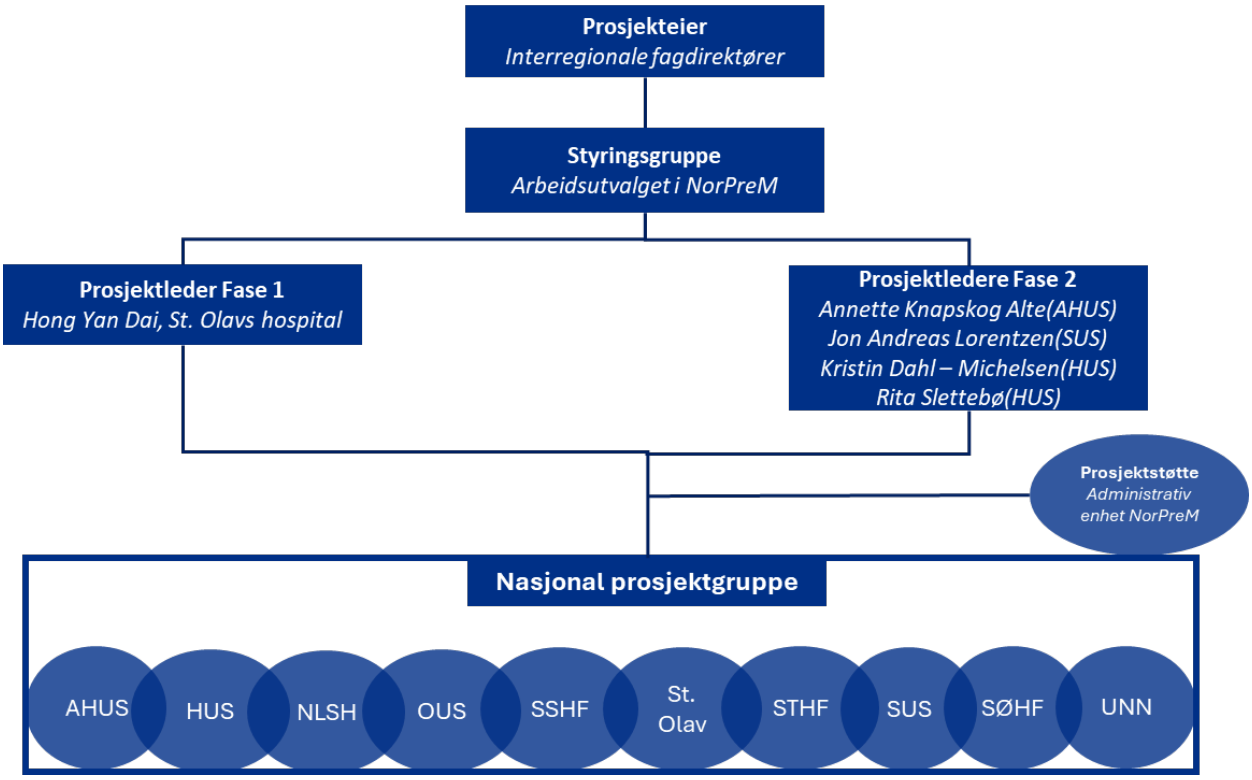
Prosjektet inngår i NorPreM sin prosjektportefølje og er forankret i arbeidsutvalget i NorPreM, som er styringsgruppen for prosjektet og eies av det interregionale fagdirektørmøtet. Prosjektstøtte er utført av administrativ enhet i NorPreM.

Initiativtaker for prosjektet var Hong Yan Dai, molekylærbiolog ved St.Olavs hospital.

**Fase 1 av prosjektet:** Ledet av Hong Yan Dai, molekylærbiolog, St.Olavs hospital. I denne fasen ble det utformet spørsmål til spørreundersøkelsen og gjennomførelse av undersøkelsen.

**Fase 2 av prosjektet:** Ledet av Annette Knapskog Alte (AHUSHF), Jon Andreas Lorentzen (SUS), Rita Slettebø (HUS) og Kristin Dahl-Michelsen (HUS). I denne fasen av prosjektet ble det gjennomført litteratursøk, sammenstilling og analyse av resultater fra spørreundersøkelsen, samt skrivearbeid og sammenstilling av prosjektrapport.

Prosjektgruppen, både i fase 1 og 2, har hatt nasjonal deltakelse fra alle helseregioner og relevante helseforetak. Deltakere fra hver av de ulike helseforetakene har deltatt i prosjektet (vedlegg 1 - Prosjektdeltakere). Disse har representert sin lokalisering og fagområde og har hatt koordinerende aktivitet mot sine foretak.




*Figur 1 – organisasjonskart*

## 2.5 Fremdrifts- og milepælsplan

Prosjektet ble utført med følgende trinn som beskrevet i vedlegg 2.

# 3. Resultat av kartlegging

Spørreundersøkelsen bekrefter påstanden om at det foreligger ulik forståelse av egnethetskriterier til NGS-analyse ved de ulike laboratoriene i Norge. Pre-analytiske betingelser som fikseringstid, valg av tumorceller og tumorandel, fragmenteringsgrad, samt kvalitetsindikatorer som kontroll av vevsuttak fra FFPE-blokk, vurdering av kvalitet og fragmentering av DNA/RNA ble trukket frem som varierende faktorer. Det benyttes i tillegg ulike ekstraksjonskit fra ulike leverandører.

Arbeidsgruppen har etablert et godt nasjonalt fagmiljø og samarbeid i prosjektfasen. En fullstendig harmonisering ser ut til å være vanskelig å oppnå ettersom det er mange ulikheter mellom laboratoriene og det er ulike betingelser for hvilke NGS-analyser som benyttes. Gruppen har derimot fått en felles forståelse for egnethetskriteriene til DNA/RNA ved NGS-analyse og har utarbeidet anbefalinger for kvalitet på materiale til NGS inkludert pre-analytiske faktorer, se tabell 1-4.

## 3.1 Oppsummering del 1: Preanalytiske betingelser

Det er varierende kjennskap til de preanalytiske prosessene som fiksativ, fikseringstid, parafininnstøping, dekalsinering og oppbevaring, men informasjon er tilgjengelig for de fleste ved behov for feilsøking. En naturlig forklaring som kommer frem, er at enkelte molekylærpatologiske laboratorier er separert fra patologiavdelingen mens andre holder til i samme lokaler.

Flertallet (70 %) har kjennskap til hvilke fiksativ rekvirentene bruker. Histolab er hovedleverandør av prefylte formalinrør med 4 % formaldehydløsning. Fikseringstid avhenger av preparatets størrelse og type vev, og det er svært varierende praksis mellom de ulike laboratoriene. Minimum tid for nålebiopsier varierer fra 2-24 timer og maks tid fra 24-74 timer. Parafin fra ulike leverandører brukes til støping av blokker. Hyppigst brukt er Histowax. Halvparten bruker EDTA som dekalsineringsløsning, men flere av de som benytter andre reagenser har planer om å bytte til EDTA-løsning. Samtlige lagrer parafinblokker ved romtemperatur til evig tid. Dette er i tråd med de nasjonale retningslinjene for lagring av blokker (3).

## 3.2 Oppsummering del 2: Kvalitetsindikatorer ved valg av tumormateriale til ekstraksjon

Det foreligger betydelig variasjon mellom laboratoriene når det gjelder kriterier for vurdering av prøvematerialets egnethet og andel tumorceller før NGS-analyse. I de fleste tilfeller er det patolog som identifiserer og markerer tumorområde fra HE-snitt, men det varierer hvordan markering av tumorområdet utføres. Omtrent halvparten av laboratoriene benytter digitale verktøy for markering av spesifiserte område fra snitt. Variasjonen i vurdering av tumormateriale medfører ulike forutsetninger for kvalitet og pålitelighet i den påfølgende NGS-analyse.

Minstekravet til andel tumorceller varierer også betydelig. Enkelte laboratorier aksepterer prøver med tilstedeværelse av enkeltceller, mens andre følger leverandørspesifikke minstekrav for analysen. Rundt 40 % av laboratoriene beregner vevsareal multiplisert med andel tumorceller for å sikre tilstrekkelig mengde DNA/RNA til analysen. Kartleggingen viser også ulikheter i rutiner for vurdering av snittflate. Noen laboratorier tar rutinemessig ekstra HE-snitt etter uttak, andre lager kontrollsnitt både før og etter uttak til ekstraksjon, mens enkelte tar kontrollsnitt kun ved synlig redusert vevsmengde i FFPE-blokken.

Forbehandling av FFPE-materiale før ekstraksjon av DNA og RNA varierer også. Flere laboratorier fjerner overflødig parafin ved beskjæring før deparafinisering. Xylen benyttes av 58 % av laboratoriene for parafinfjerning, men spørreundersøkelsen spesifiserer ikke hvilke øvrige reagenser som eventuelt benyttes.

## 3.3 Oppsummering del 3: Kvalitetskriterier ved ekstraksjon av DNA/RNA

Ekstraksjonsmetodene varierer mellom laboratoriene og er avhengig av vevstype, hastegrad og antall prøver. Det benyttes både kolonnebaserte og kulebaserte metoder for isolering av DNA/RNA. Per 2024 benyttes et bredt spekter av ekstraksjonskit (se vedlegg 5). Kartleggingen viser at 30 % av laboratoriene benytter Genexus Purification System fra Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific), og flere planlegger implementering i nær fremtid.

De fleste laboratoriene benytter enten NanoDrop (spektrofotometrisk måling) eller Qubit (fluorometrisk måling) for å vurdere nukleinsyrekonsentrasjonen før analyse. Under halvparten av laboratoriene (43 %) rapporterer at de utfører fragmentanalyse, f.eks. TapeStation, Bioanalyzer eller real time PCR (qPCR). Slike analyser gjennomføres enten rutinemessig eller som ledd i feilsøking ved dårlig kvalitet på NGS-resultatene.

Laboratoriene følger i hovedsak produsentens anbefalinger for input mengde DNA/RNA til NGS, men over halvparten (54 %) oppgir at de også analyserer prøver med lavere konsentrasjon enn anbefalt. Enkelte laboratorier sekvenserer alle prøver uavhengig av konsentrasjon. Det rapporteres om få alternative strategier ved lav prøvekvalitet. Den mest utbredte tilnærmingen er å sekvensere prøven på nytt eller å innhente nytt prøvemateriale.

## 3.4 Oppsummering del 4: Betraktning av kvalitet på DNA/RNA ved analyse og tolkning av NGS

Det praktiseres ulike grenseverdier for vurdering av DNA/RNA-parametere ved tolkning av NGS-data, særlig med hensyn til materialets egnethet. Det benyttes ulike genpaneler og ulike sekvenseringsplattformer. Flertallet (80 %) benytter Ion Torrent fra Thermo Fisher Scientific, hvorav 30 % bruker Genexus- systemet, resterende 20 % oppgir at de benytter Illumina.

Enkelte av Ion Torrent-panelene er in vitro-diagnostiske (IVD)-godkjente, men flere laboratorier benytter også paneler uten slik godkjenning. De fleste større paneler på både Ion Torrent- og Illumina-plattformene mangler IVD-klassifisering.

Kartleggingen avdekket betydelig variasjon i hvilke parametere som benyttes for å vurdere sekvenseringskvalitet, samt om det anvendte materiale har tilstrekkelig tumorandel og kvantitet. Kun 33 % følger leverandørs anbefalinger for tumorandel, mens 72 % følger metodens input mengde for DNA/RNA. Det fremgår ikke om avvik fra anbefalt tumorandel eller inputmengde er validert ved metodeimplementering. Ved utilstrekkelig kvalitet på prøvematerialet oppgir 69 % av laboratoriene at de enten rekvirerer ny prøve, utfører makrodisseksjon og gjentar analysen eller søker etter alternative prøver i samarbeid med patolog før prøven eventuelt rapporteres ut som mislykket eller inkonklusiv.

33 % av laboratoriene har definert en nedre grense for akseptabel fragmenteringsgrad av DNA/RNA. Fragmenteringsgrad kan vurderes enten ved bruk av analysens innebygde parametere eller ved tilleggsanalyser, som f.eks. ved TapeStation. 43 % rapporterer at de gjør dette rutinemessig. Over halvparten (54 %) vurderer grad av nekrose i forhold til fragmenteringsgrad og får oppgitt mengde inflammatoriske celler i vevet.

# 4. Anbefaling

Det har gjennom prosjektet kommet frem flere punkter som prosjektgruppen anser som viktige å belyse, i tillegg til å komme med nasjonale anbefalinger. Dette gjelder både pre-analytiske faktorer før ekstraksjon (tabell 1-3), men også vurderinger etter NGS resultat og tolking i forhold til om ekstraksjon og andre faktorer har vært tilfredsstillende (tabell 4). Utdypende tekst om de ulike faktorene, og hvordan de kan påvirke NGS-resultat, er gitt under tabellen der det er vurdert nødvendig.

## Del 1: Preanalytiske betingelser

*Tabell 1: Preanalytiske betingelser*

| Preanalytiske faktorer | Anbefalinger |
|---|---|
| **God arbeidsflyt** | • God kommunikasjon mellom patologiavdelingen og laboratoriet som utfører molekylære analyser.<br>• Sporing på prosessene som utføres ved patologiavdelingene.<br>• Ved innføring av nye prosedyrer på patologiavdelingen bør effekten på DNA/RNA kvalitet testes før implementering.<br>• Innføring av nasjonale retningslinjer for fiksering, fremføring og innstøping |
| **Fikseringsmiddel** | • Bruk lavkonsentrert (4 % formaldehyd) nøytralt bufret formalin (kontroller pH ved verifisering)(4, 5).<br>• Formalin bør brukes innen 24 timer etter fortynning til 4 % for å sikre stabil konsentrasjon og hindre effekt av polymerisering (6). |
| **Dekalsinering** | • Unngå bruk av dekalsinert prøvemateriale dersom mulig, da dekalsinering bryter ned nukleinsyrene.<br>• Ved behov for dekalsinering anbefales bruk av bufret EDTA, da sterke syrer i større grad skader nukleinsyrene (6).<br>• Vurder bruk av instrumenter (f.eks. Faxitron) for å overvåke porøsitet og stoppe dekalsineringsprosessen i tide (7). |
| **Fikseringstid** | • Patologiavdelingenes retningslinjer for fikseringstid bør være optimalisert i forhold til DNA/RNA kvalitet. |

| | |
|---|---|
| | • Unngå overfiksering av vev for å hindre formalin-induserte kryssbindinger, deamineringer og fragmentering av nukleinsyrer (8).<br>• Unngå underfiksering ved å gjennomskjære store preparater for å sikre rask infusjon av formalin slik at DNA/RNA bevares.<br>• Unngå fiksering av nålebiopsier og små biopsier over helg for å hindre overfiksering som gir større grad av formaldehyd-induserte kryssbindinger, deamineringer og fragmentering av nukleinsyrer (8).<br>• Ha dialog med klinikk om mulighet for eget vevsuttak til molekylære analyser der det er vurdert nødvendig. |
| **Fremføring** | • Patologiavdelingenes retningslinjer for fremføring og innstøping bør være optimalisert i forhold til DNA/RNA kvalitet.<br>• Ved automatisert hurtigfiksering og fremføring: Unngå hurtigfiksering ved høy temperatur da dette øker degraderingen av nukleinsyrene<br>• Velg egnet fremføringsprogram etter vevstype, fettinnhold og størrelse<br>• Erstatning for Xylen i fremføringsprosessen har vist god effekt på DNA/RNA-kvalitet (9). |
| **Parafinkvalitet** | • Ulike typer parafin kan påvirke molekylære analyser. Undersøk om parafinen er egnet for molekylære analyser ved bytte av parafinleverandør. |

**God arbeidsflyt**

Grunnlaget for god DNA/RNA-kvalitet legges i den preanalytiske fasen av arbeidet. Et tett og strukturert samarbeid med patologiavdelingen i forbindelse med prosessene ved fremstilling av FFPE-materiale er essensielt for å sikre god kvalitet på pasientmateriale til NGS-analyser. Laboratoriepersonell med ansvar for ekstraksjon av nukleinsyrer bør involveres i beslutningsprosesser hvor patologiavdelingen endrer betingelser ved de preanalytiske forholdene, som f.eks. ved bytte av fikseringsmiddel, dekalsineringsløsning, parafinvoks, endret fikseringstid eller fremføringsprogram. Slike endringer bør valideres på molekylært nivå for å sikre at de ikke påvirker kvaliteten på DNA/RNA-analyser negativt.
Stor variasjon i prosessene ved patologiavdelingene mellom ulike helseforetak gjør det mer utfordrende for molekylærpatologiske laboratorier å være samkjørte på DNA/RNA-kvalitet fra FFPE-materiale. Innføring av nasjonale retningslinjer for fiksering/fremføring/innstøping, samt sporing av nevnte prosesser vil redusere variasjon mellom helseforetakene og dermed gjøre det enklere å sikre likeverdig tilbud for pasienten.

På et organisatorisk nivå anbefales det at de molekylærpatologiske laboratoriene etablerer faste kommunikasjonslinjer med patologiavdelingen, med jevnlige treffpunkt. Dette vil legge til rette for

effektiv informasjonsutveksling mellom enhetene og videre bidra til økt effektivitet og styrket pasientsikkerhet.

**Dekalsinering**

Dekalsinert prøvemateriale bør unngås da dekalsinering bryter ned nukleinsyrer. Ved behov anbefales bruk av bufret EDTA fremfor sterke syrer (6), samt bildeteknologi for å kunne stoppe dekalsineringen i tide. Faxitron teknologien benytter høyoppløselige røntgenbilder for å lokalisere kalk i vevet og gir dermed mulighet for å tilpasse dekalisneringstid og kjemikalievalg (7). Instrumentet kan også brukes til å kartlegge om materiale (f.eks. beinmarg) har oppnådd porøsitet underveis i dekalsineringsprosessen og dermed stoppe dekalsineringen på et tidligere tidspunkt. Dette beskytter vevsstrukturen, bevarer morfologien og er gunstig for alle nedstrøms analyser.

**Fiksering og fremføring**

Valg av raskere automatiserte fikserings- og fremføringsprosesser med høy temperatur kan redusere svartid og virke fordelaktig for pasienten, men må tilpasses kravene til både molekylærpatologiske og immunhistokjemiske analyser. F.eks. ved fiksering av prostata nålebiopsi anbefales 3–6 timers fikseringstid til NGS (10), mens lengre tid kan være nødvendig for immunhistokjemi. Det fremkom også av prosjektet at flere laboratorier hadde problemer med sekvensering av nålebiopsier som ble liggende i fikseringsmiddel over helg. Overfiksering kan føre til formaldehyd-induserte kryssbindinger, deamineringer og fragmentering av nukleinsyrer og bør unngås for å oppnå en vellykket sekvensering (8). Ved store forskjeller i optimale forhold bør det etableres dialog med klinikk og vurderes egne vevsuttak til molekylære analyser.

## Del 2: Vurdering og utvelgelse av prøvemateriale

*Tabell 2: Vurdering og utvelgelse av prøvemateriale*

| Preanalytiske faktorer | Anbefalinger |
|---|---|
| **Vurdering av tumormateriale** | • Bruk prøvemateriale som er mest relevant for pasientens nåværende sykdomsbilde (11, 12).<br>• Snittet som brukes til å vurdere tumormateriale må være representativt for det vevet som er igjen i blokken<br>• Alle celler med cellekjerne i område valgt ut ved vurdering må tas med i beregningen av tumorandel (13)<br>• Velg området med høyest tetthet av intakte neoplastiske celler (13).<br>• Unngå inflammatoriske celler, stroma, nekrose og slim (14).<br>• Andelen tumorceller i prøven anbefales å være minst det dobbelte av deteksjonsgrensen for påvisning av mutasjoner for den aktuelle metoden (15). |

| | |
|---|---|
| **Kvalitetssikring av vurdering** | • Etablere nasjonal standardisert prosedyre for vurdering av tumorandel i FFPE-materiale (11-13).<br>• Vurdering bør utføres/overvåkes av patolog (13, 14).<br>• Ha regelmessig opplæring og kvalitetssikring også med eksterne kvalitetsprogrammer (11-13).<br>• TTT-kurs (train the trainer) som har fokus på desentralisert fagopplæring (16).<br>• Den vurdert andelen tumorceller, samt en patologisk beskrivelse av valgt prøvemateriale, bør inkluderes i svarrapporten for å sikre dokumentasjon av prøvens egnethet og NGS tolkningens kontekst (6, 14).<br>• Bruk digitale hjelpemidler om det er tilgjengelig. |
| **Preparatets alder** | • Velg FFPE-materiale av nyere dato dersom tilgjengelig. RNA forringes ved årelang lagring, DNA kan også påvirkes ved langtidslagring (> 4 år), men har bedre holdbarhet enn RNA (5). |
| **Makrodisseksjon** | • Makrodisseksjon bør gjennomføres der det fører til økt tumorandel.<br>• Dersom utvalgt tumorområde er lite og omgitt av uegnet vev, er det viktig med god dialog med dem som skal makrodissekere med tanke på vanskelighetsgrad ved uttak av vevsområde og krav til tumorandel for metodevalg. |
| **Mengde snitt/ vevsareal ved ekstraksjon** | • Følge metodens anbefalinger med hensyn til mengde vev som snittes.<br>• Ta hensyn til areal (biopsi størrelse x antall snitt).<br>• Ved mindre vevsoverflate og mye parafin, anbefales det å fjerne overflødig parafin i snitteprosessen. |
| **Kontrollsnitt** | • Før uttak: Snittet som brukes til kontroll må være representativt for det vevet som er igjen i blokken. Bruk eventuelt immunsnitt om det er mer representativt enn HE.<br>• Etter uttak: For vurdering av gjenværende tumorandel i blokk og kvalitetssikring av vurdert tumorandel. |
| **Optimal snitterutine** | • For å spare materiale og for å unngå å snitte seg ut av tumorområde, bør snitting skje i så få omganger som mulig. Dette må gjøres under rene forhold for å unngå krysskontaminering mellom prøver. |

**Vurdering av tumorandel og bruk av makrodisseksjon**

Valg av biopsi til analyse er viktig for å sikre riktig diagnose og behandling. Metastaser kan ha utviklet nye genetiske endringer, aktuelle for målrettet behandling, som ikke var til stede i primærtumor. Bruk derfor alltid prøvemateriale som er mest relevant for pasientens nåværende sykdomsbilde (11, 12).

En sentral parameter som påvirker prøvematerialets egnethet for NGS analyse, er korrekt vurdering av andel tumorceller. For at mutasjoner skal kunne påvises med tilstrekkelig sikkerhet, må en viss mengde mutert DNA/RNA være til stede i prøven. Overestimering av tumorandel, særlig i prøver med lavt tumorinnhold, kan føre til falskt negative resultater, noe som har direkte konsekvenser for pasientbehandling. Tumorandel har også betydelig innvirkning på beregning av kopitallsvariasjon, ettersom denne parameteren inngår i algoritmene som estimerer antall genkopier (17). Den teoretiske beregningen av tumorandelen i et histologisk område baserer seg på kvantitativ celletelling. Dette innebærer at man identifiserer og teller antall neoplastiske celler (tumorceller) i forhold til det totale antallet celler med synlig cellekjerne i området etter følgende formel: Tumorandel (%) = (Totalt antall neoplastiske celler / Totalt antall celler med cellekjerne) × 100. Alle celler med cellekjerne i område valgt ut til vurdering må tas med i beregningen (13). I praksis baseres vurderingen imidlertid ofte på visuell estimering fremfor nøyaktig celletelling. Studier viser at vurdering av tumorandel har en høy grad av usikkerhet med store subjektive variasjoner. (14, 18-20). Det anbefales derfor bruk av standardisert prosedyre, regelmessig opplæring og kvalitetssikring (14, 18, 19). Et forslag for kvalitetssikring er eksterne kvalitetsprogrammer som for eksempel «GenQA Tissue i- assessement modul» for vurdering av tumorandel og eventuell makrodisseksjon fra FFPE og ferskfrosset vev (21).

Vurdering av tumorandel bør utføres av patolog. Om annet personell utfører vurderingen må de være godt opplært og ha patolog tilgjengelig for konsultasjon (14, 15). Ved vurdering av tumorandel bør området som velges for analyse ha høyest mulig tetthet av intakte neoplastiske celler, og samtidig inneholde minst mulig andel inflammatoriske celler, stroma, nekrose, melanin og slim (14). Høy grad av nekrose kan føre til mislykket sekvensering som følge av deamineringer, artefakter og fragmentering. Siden inflammatoriske celler ofte er små og tettliggende er det lett å underestimere bidraget av normalt DNA/RNA til prøven, og dermed feil estimere tumorandelen. Melanin fra melanomceller kan i høye konsentrasjoner hemme PCR-reaksjoner (22). Det finnes ulike rensemetoder for å fjerne melanin (23). Det er imidlertid publisert studier som viser at melanin ikke påvirker mutasjonsanalyse som f.eks. ved bruk av Idylla, som da kan benyttes som en alternativ metode (24).

Ettersom mange somatiske mutasjoner forekommer i heterozygot form, bør tumorandelen i prøven være dobbelt så høy som deteksjonsgrensen (spesifisert av produsent eller fastsatt ved intern validering) til den aktuelle mutasjonsanalysen (15). Makrodisseksjon anbefales i de fleste tilfeller der dette kan øke tumorandel med mindre hele snittflaten allerede har høy nok tumorandel med god margin. Enkelte genpaneler krever en høy tumorandel for å kunne korrekt beregne parametere som kopitallsvariasjon. Makrodisseksjon vil også øke sannsynligheten for å påvise mutasjoner som er til stede i subkloner. Ved små tumorområder kan mikrodisseksjon med f.eks. laser vurderes om slikt utstyr er tilgjengelig for laboratoriet.
Den vurdert tumorandelen bør dokumenteres i svarrapporten og inngå i den samlede vurderingen av analysens pålitelighet (6, 14). Dersom tumorandelen er lavere enn det dobbelte av metodens deteksjonsgrense for mutasjoner bør resultater rapporteres med forbehold om at det er økt fare for falske negative funn (se del 4).

Kunstig intelligens har potensial til å vurdere tumorandel nøyaktig og konsekvent (25-27). Ved digitalisering av snitt anbefales det bruk av digitale verktøy dersom tilgjengelig.

**Preparatets alder**

Langtidslagring av FFPE-materiale påvirker deaminering av nukleinsyrene og fragmentering. En kjent DNA-skade ved langtidslagring av DNA er deaminering av cytosin til uracil noe som kan gi artefakter som punktmutasjoner. Behandling med Uracil-DNA-glykosylase (UDG) vil kunne fjerne uracil fra DNA, men det kan også føre til tap av fragment (28). Erfaring fra laboratorier deltatt i spørreundersøkelsen viser at eldre preparater (> 5 år) ofte har mer fragmentert DNA og er av for dårlig kvalitet til å kunne utføre NGS, mens det i litteraturen er funnet en grense på 7 år for DNA og 4 år for RNA (magekreft og kolorektal kreft) (5). Det er viktig å være oppmerksom på begrensningene ved langtidslagring av FFPE-materiale. Dersom det er utført NGS med eldre preparater uten funn anbefales det å be om ny biopsi.

**Mengde snitt/vevsareal**

Følg leverandørs anbefalinger for antall vevssnitt, tykkelse/vevsareal og bruk av makrodisseksjon. Antall snitt må også sees i sammenheng med biopsistørrelse, tumorandel og type prøvemateriale (pleuravæske kan f.eks. ofte ha lite tumorceller). Ulike ekstraksjonsmetoder har ulik sensitivitet for input av vev. Både For mye og for lite vev i ekstraksjonen fører til redusert DNA/RNA-konsentrasjon, som kan resultere i at utbyttet blir for liten i henhold til hva NGS metoden krever av input. Avvik fra produsentens anbefalinger bør derfor valideres internt. Flere laboratorier har gode erfaringer med bruk av tabeller, som angir anbefalt antall snitt ved gitt vevsareal, fra produsentenes ekstraksjonsprotokoller.

**Kontollsnitt**

Snittet som brukes til å vurdere tumorandel må være representativt for det vevet som er igjen i blokken. Det siste immun-snittet kan benyttes framfor HE-snitt om det er mer representativt. Det anbefales å ta et ekstra HE-snitt etter uttak til NGS-analyse for å sjekke om tumorandelen har endret seg. Om tumorandelen har blitt markant lavere er det risiko for at man har mye mindre input enn det metoden anbefaler og det kan resultere i falske negative/falske lavfrekvente resultater. Det kan også være behov for å justere tumorandel i forhold til riktig beregning av kopitallsvariasjon. Om det ikke er tumorceller til stede i kontrollsnittet tatt etter uttak til NGS-analyse, bør det tas høyde for at den reelle tumorandelen kan være langt lavere enn først antatt, og resultatene må tolkes deretter.

**Optimal snitterutine**

For hver omgang med snitting må mikrotomet stilles inn på nytt og snittoverflaten skjæres ren. Dette medfører tap av materiale og det er fare for å snitte seg ut av tumorområdet. Det anbefales derfor å snitte i så få omganger som mulig for å unngå tap av tumorvev, spesielt for blokker med lite materiale. Når det snittes til molekylære analyser er det viktig at den som snitter følger rutiner for å unngå kontaminering mellom blokker. Det er viktig å ha et system på rekkefølgen av snitt, for å kunne følge utviklingen av tumor nedover i blokken. F.eks. ved bruk av vannbad med flere snitt på samtidig. Rekkefølgen må også komme tydelig frem ved bruk av digital patologi. I tilfeller der det ikke er tilstrekkelig materiale til både immun- og molekylære analyser er det patolog sitt ansvar å prioritere.

## Del 3: Ekstraksjonskriterier

*Tabell 3: Ekstraksjonskriterier*

| Preanalytiske faktorer | Anbefalinger |
|---|---|

| | |
|---|---|
| Fjerne parafin | • Fjern all parafin før ekstraksjon.<br>• Om parafin fjernes med Xylen er det viktig å rehydrere vevet med etanol for at vevet videre kan lyseres.<br>• Alternativer til Xylen, f.eks. kommersielle. deparafiniseringsløsninger som kan forbli i røret ved lysering, anbefales da dette er mindre helseskadelig å jobbe med. |
| Lysering av vev | • Langtidsbehandling (over natt) med lyseringsbuffer og Proteinase K (PK) øker DNA/RNA utbytte, og inaktivering av PK med varmebehandling etter lysering øker kvaliteten til NGS (29, 30). |
| Ekstraksjonsmetode | • Velg egnet rensemetode. Ta hensyn til type vevsmateriale, vevsstørrelse, risiko for kontaminering, hastegrad og antall prøver.<br>• Bruk automatiserte ekstraksjonsmetode for å øke reproduserbarheten og minske manuelle feilkilder (31). |

**Fjerne parafin**

Parafin danner en fysisk barriere på vevet og må derfor fjernes før lysering av cellene og nukleinsyre ekstraheres. Den tradisjonelle metoden for fjerning av parafin er bruk av Xylen. Ved bruk av Xylen er det viktig å påse at vevet blir rehydrert i etanol før videre lysering og enzymatisk behandling av vevet. Det finnes kommersielle og oljebaserte løsninger som fjerner parafinet og kan forbli i prøverøret ved lysering av prøvematerialet. Disse er mindre helseskadelig og brukes i flere av laboratoriene i Norge.

**Lysering av vev**

Lysering av celler kan utføres med ulike teknikker; fysisk, enzymatisk og kjemisk. Den vanligste teknikken for lysering av celler fra FFPE-materiale er enzymatisk ved bruk av lyseringsbuffer og Proteinase K. Ufullstendig enzymatisk nedbryting av vevet kan føre til redusert DNA/RNA utbytte. Påse at vevet er fullstendig nedbrutt før ekstraksjon. Tilsett evt. mer Proteinase K og inkuber ytterligere. Langtidsbehandling (over natt) med Proteinase K har vist økt DNA/RNA-utbytte, og varmebehandling på 95°C inaktiverer proteinase og øker ytterligere kvaliteten til NGS (29, 30). Ta høyde for at de ulike ekstraksjonsmetodene har ulik ytelsesgrad med krav og variasjon med tanke på forbehandling.

**Ekstraksjonsmetode**

Det finnes et bredt spekter av ekstraksjonsmetoder; kolonne- og magnetkulebaserte, som benyttes for FFPE-vev til NGS-analyser nasjonalt. De ulike ekstraksjonsmetodene og leverandørene har ulike effekt, renhetsgrad og bindingsevne (hvor mye nukleinsyre som bindes til membran/kuler før kapasiteten er nådd). Automatiserte metoder anbefales for å øke reproduserbarhet og redusere mulighet for manuelle feil. Ved innføring av en ny ekstraksjonsmetode er det ulike faktorer å ta stilling til; risiko for kontaminering mellom pasientprøver for å opprettholde god pasientsikkerhet, antall prøver som kan renses samtidig for å kunne levere raske svar, i tillegg til brukervennlighet, type vevsmateriale og kvalitet på DNA/RNA etter ekstraksjonen. Kvalitet av DNA/RNA må også verifiseres mot nedstrøms analyse som skal benyttes. Kolonnebaserte metoder egner seg bedre til større vevsbiopsier, mens

kulebaserte metoder gir generelt høyere renhet og mindre fragmentert DNA/RNA og egner seg best til mindre nålebiopsier (32-34).

## Del 4: Kvalitetsmål

*Tabell 4: Anbefalinger og vurdering av andre faktorer for å sikre prøvekvalitet ift. NGS resultat*

| Forbedringsområder | Anbefalinger |
|---|---|
| **Kvantitering** | • Fluorometer bør benyttes ved kvantitering av nukleinsyrer.<br>• Konsentrasjon ved gitte fragmentlengder kan estimeres ved bruk av qPCR.<br>• Konsentrasjonsmåling av DNA/RNA bibliotek bør vurderes for å sikre tilstrekkelig input i NGS. |
| **Kvalitetstester** | Bør gjennomføres for prøver med lav DNA/RNA-konsentrasjon og/eller tegn til fragmentering:<br>• Kvalitetsmåling av fragmenteringsgrad med andre teknologier f.eks.; TapeStation, Bioanalyzer eller qPCR.<br>• For større genpanel: Undersøke kvalitetsdata fra NGS for tegn på fragmentering, |
| **Dårlige kvalitetsmål i henhold til produsentens anbefalinger/internt validerte grenseverdier** | • Dårlige kvalitetsmål* omfatter:<br>o Lav DNA/RNA konsentrasjon<br>o Lav tumorandel<br>o Høy fragmenteringsgrad<br>o Dårlige kvalitetsmål fra NGS, f.eks. lav dekning / «NO CALL» i områder av interesse.<br>• Usikre resultater bør bekreftes med alternative metoder som f.eks. qPCR, Sanger eller FISH om det er mulig.<br>• Det bør vises forsiktighet ved rapportering av negative og lavfrekvente funn. Benytt egnet kommentar ved rapportering der usikkerheten i prøvesvaret kommer tydelig fram. Presiser om det er enkelte gener eller områder av gener av interesse som har høy usikkerhet. |
| **Kontrollskjema - trender** | • Overvåkning av kvalitetskontroll-parametere over tid for både sekvensering og prøve for å lettere identifisere mulige feilkilder. |

* For mer informasjon om kvalitetsparametre for vurdering av en sekvensering, se tabell i vedlegg 6. I tillegg henvises det til NorPreM sitt pågående prosjekt; Harmonisering av varianttolkning og bruk av tolkningsverktøy (P-1-008) (2) for mer detaljert informasjon om tolkning av NGS.

**Kvantitering**

Kvantitativ måling av DNA/RNA er en kritisk del av molekylærbiologiske analyser, og valg av metode har stor betydning for nøyaktighet og anvendbarhet. Konsentrasjonsmåling med fluorometer er å foretrekke fremfor spektrofotometer da metoden binder fluorescerende fargestoffer spesifikt til nukleinsyrene, mens spektrofotometeret kun måler absorbert bølgelengde. NanoDrop (spektrofotometer) kan vise 2-10 ganger høyere konsentrasjon enn måling med Qubit (fluorometer) (8), NanoDrop er i tillegg følsom for forstyrrende bakgrunns-signal i blank som kan gi kunstig høy konsentrasjon. Kvantitative målinger (fluorometriske eller spektrofotometriske) måler total nukleinsyre og tar ikke høyde for fragmentering av nukleinsyrene. Sterkt fragmenterte prøver med høy konsentrasjon, som fortynnes før NGS-analyse, kan gi falske negative resultater. En alternativmetode er å måle mengden nukleinsyrer ved ønsket fragmentlengde ved hjelp av qPCR eller digitaldråpe PCR (ddPCR) (6, 35).

Ulike metoder for bibliotekspreparering, og varierende prøvekvalitet kan gi ulik kvalitet og mengde templat for sekvensering. Erfaringer på lab viser at konsentrasjonen på ferdig bibliotek varierer i forhold til hva produsent har satt av forventet optimal konsentrasjon. Kvantitering av bibliotek kan sikre mengden input av bibliotek inn i sekvenseringsreaksjonen. Kvantifisering kan gjøres ved fluorometer og elektroforese, evt. ved bruk av q-PCR-kit avhengig at hvilke kit som er brukt til bibliotekspreparaering.

**Kvalitetstester**

Fragmenteringsgrad av nukleinsyre bør alltid evalueres ved validering av nye NGS metoder. Kvalitet på utbytte og materialinput kan kontrolleres med ulike metoder, listet opp i tabell 4, og forklart ytterligere i punktene under. Metodene er et utvalg fra laboratoriets rutiner, men også hva som foreligger på markedet anno 2025:

- Analyse av fragmenteringsgrad ved qPCR.
    - Måling av mengde amplifisert human genom ekvivalent (HGE) i hver prøve ved inkorporering av unike molekylære indekser (UMI). Dette måler kompleksiteten til hvert bibliotek (35).
    - Q- ratio estimert med assay fra Kapa Biosystems. Forholdet mellom mengden amplifisert produkt ved forskjellige fragmentlengder gir en Q-ratio. Lavere ratio indikerer mer fragmentert materiale (5).
    - Infinium HD FFPE QC assay control kit for DNA fra Illumina (36).
- Analyse av fragmenteringsgrad ved elektroforese assays
    - Kommersielle fragmentlengde assays som f.eks. TapeStation eller Bioanalyzer. Kvalitetsmål kan være DV200 Index (prosent av fragmenter > 200bp lengde) (37).

Uegnet DNA/RNA fra FFPE-materiale, blant annet grunnet fragmentering, viser seg som ikke uniform coverage på tvers av amplikon, såkalt coverage bias. For enkelte sekvenseringspanel vil prøven også ha en høy MAPD verdi (se vedlegg 4, begrepsbibliotek). Det kan benyttes bioinformatiske verktøy for å vurdere deknings uniformitet som et mål på fragmentering av NGS-data f.eks. fold 80 base penalty.

Dette verktøyet kan brukes på større genpanel (29). Enkelte paneler som f.eks. Genexus DX Express Test har egen internkontroll for fragmenteringsgrad.

Det er viktig å alltid gå gjennom kvalitetsparametrene på enkeltprøver etter endt sekvensering/NGS-analyse for å påse at QC-kriterier er oppfylt.

**Dårlige kvalitetsmål i henhold til produsentens anbefalinger/internt validerte grenseverdier**

DNA/RNA-konsentrasjon alene angir ikke kvaliteten på materialet. Det er viktig å vurdere både konsentrasjon, tumorandel og eventuelt fragmenteringsgrad. Tilstreb å følge leverandørs anbefalinger ift. konsentrasjon, input –mengde og tumorandel, eller gjør egen validering.

Bruk av materiale med lav tumorandel og/eller lav konsentrasjon øker risikoen for både falske negative og falske positive resultater. Når tumorandel er lav kan det oppstå falske negative resultater ved at reelle varianter mistolkes som artefakter, eller at varianten forsvinner under amplifisering. Ved fusjonsanalyse av RNA kan det danne seg uspesifikke artefakter som f.eks. høye avlesninger i RNA ekson varianter som er sjeldne (mulig falske positive). Lav tumorandel kan også føre til overestimering av kopitallsvariasjon, som igjen kan gi opphav til falske positive funn. Dersom tumorandelen til prøven har blitt feilestimert f.eks. på grunn av høy andel inflammatoriske celler, kan det føre til feilaktige konklusjoner. Drivermutasjoner har ofte høyere allelfrekvens. Påvisning av slike mutasjoner med lav allelfrekvens, kombinert med fravær av øvrige funn, kan indikere lav tumorandel, utilstrekkelig input mengde eller lav dekning.

Dersom prøven har dårlige kvalitetsmål som lav konsentrasjon, lav tumorandel, eller høy fragmenteringsgrad og/eller NGS-QC under anbefalt nedre grense for NGS-panelet, anbefales det å vurdere ny sekvensering, spesielt dersom det er ingen sekvenseringsfunn. Det bør undersøkes om analysen eventuelt kan utføres på en annen blokk. Alternativt kan usikre funn bekreftes med annen metode. Det kan være ulike grader av fragmentering i en prøve og funn må vurderes i forhold til dette med en kommentar ved utsvar eller behov for konfirmerende tester. Ved sterk fragmentering bør ikke en prøve med negativt resultat svares ut som negativ.
Ved rapportering av usikre resultater, inkludert villtype varianter med behandlingskonsekvens som har for dårlig dekning, bør rapporten inneholde en forklarende kommentar tilpasset konteksten der usikkerheten kommer tydelig fram. F.eks.;

“Inkonklusivt sekvenseringsresultat” eller
«Prøvematerialet er ikke av optimal kvalitet for NGS-analyse. Preparatet er cellefattig/har lav konsentrasjon og/eller tumorandelen under metodens anbefalte grense (< X %). Det er ikke gjenværende tumorvev i blokken etter sekvensering. Et negativt resultat kan derfor ikke utelukke tilstedeværelse av lavfrekvente varianter maskert av lav tumorandel. Estimering av eventuelle villtype varianter kan være lavere enn normalt, og CNV-analyser kan ikke tolkes pålitelig grunnet begrensninger i forhold til tumorandel krav for metoden.»

**Bruk av alternative metoder ved usikre resultater eller mislykket NGS-analyse**

Usikre (lavfrekvente) funn bør bekreftes med alternative metoder om det er mulig. qPCR analyser er ofte tilgjengelig for vanlige mutasjoner. Siden disse analysene kopierer opp spesifikke muterte sekvenser er de mindre sårbare for lav tumorandel så lenge det er tilstrekkelig med muterte sekvenser til stede i prøven. For fusjoner eksisterer det også qPCR analyser, som f.eks. IDYLLA Gene Fusion fra Biocartis som dekker flere fusjoner som er aktuelle for ikke-småcellet lungekreft. Flouresence in situ hybridisering (FISH) kan være en aktuell metode for bekreftelse av fusjoner og kopitallsendringer, som er spesielt nyttig ved sparsomt materiale siden enkeltceller kan undersøkes.
Supplerende undersøkelser bør også vurderes om det mangler eller er for dårlig data fra sekvensområder av interesse (NO CALL områder) som kan skyldes f.eks. lav dekning eller for mye bakgrunnsstøy (se vedlegg 4; begrepsbibliotek).

**Kontrollskjema - trender**

Det anbefales å overvåke kvalitetsparametere fra sekvensering over tid. Dette kan lette feilsøking og øke sporbarhet, da enkelte problemer kan gjelde hele sekvenseringen/bibliotek/chip/reagens lot etc., mens andre kun er prøveavhengig (2).

## Konklusjon og fremtidige behov

Lik praksis for egnethetskriterier er vanskelig å oppnå ettersom det er mange ulikheter mellom laboratoriene og det er ulike betingelser for hvilke NGS-analyser som benyttes. Prosjektgruppen har imidlertid oppnådd økt kunnskap og forståelse av kvalitet av DNA/RNA til bruk i NGS analyse. For å standardisere fremstilling av FFPE-materiale anbefaler prosjektgruppen at det bør opprettes et eget prosjekt for nasjonal standardisering ved fremstilling av FFPE ved patologiavdelinger. Mest mulig harmonisering ved vurdering av tumormateriale bør implementeres gjennom nasjonalt samarbeid, utdanning av LIS, samt at de preanalytiske betingelsene bør inngå i svarrapport til rekvirent.
Prosjektgruppen anbefaler et levende samarbeid i eksisterende nasjonale nettverk, f.eks. Undernettverk for molekylærpatologi (UMP) i NorPreM eller Norsk forening for molekylærpatologi (NFMP). Fagfeltet molekylærpatologi er under rask utvikling og det er derfor behov for jevnlig gjennomgang for å opprettholde og videreføre samarbeidet som prosjektgruppen har oppnådd.

## Referanseliste

1. Norprem - Om nettverket [Available from: https://norprem.no/om-nettverket.
2. NorPreM Prosjektporteføje [Available from: https://norprem.no/aktiviteter/prosjekter.
3. Nasjonale retningslinjer for lagring av blokker, glass og digitale snitt 2019 [Available from: https://www.spesialisthelsetjenesten.no/4ad739/siteassets/seksjon/ikt/documents/nasjonal-digital-patologi/lag-p-retningslinjer-lagring-av-blokker-glass-digitale-snitt.pdf.
4. Amemiya K, Hirotsu Y, Oyama T, Omata M. Relationship between formalin reagent and success rate of targeted sequencing analysis using formalin fixed paraffin embedded tissues. Clin Chim Acta. 2019;488:129–34.

5. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Nakagawa S, Sato N, Kaneko K, et al. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. J Surg Res. 2017;220:125–32.
6. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N, Edsjo A, Rouleau E, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol. 2014;67(11):923–31.
7. Faxitron® Path Specimen Radiography System [Available from: https://www.hologic.com/FaxitronPath.
8. Arreaza G, Qiu P, Pang L, Albright A, Hong LZ, Marton MJ, et al. Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. Int J Mol Sci. 2016;17(9).
9. Vincek V, Nassiri M, Knowles J, Nadji M, Morales AR. Preservation of tissue RNA in normal saline. Lab Invest. 2003;83(1):137–8.
10. Gonzalez D, Mateo J, Stenzinger A, Rojo F, Shiller M, Wyatt AW, et al. Practical considerations for optimising homologous recombination repair mutation testing in patients with metastatic prostate cancer. J Pathol Clin Res. 2021;7(4):311–25.
11. Bertucci F, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Garnier S, Carbuccia N, et al. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. Oncotarget. 2016;7(19):27208–19.
12. Ree AH. MetAction: Actionable Targets in Cancer Metastasis – from

Bed to Bench to Byte to Bedside, Oslo universitetssykehus

(OUS) og Akershus universitetssykehus (AHUS). Onkonytt. 2013:4.
13. Hatanaka Y, Kuwata T, Morii E, Kanai Y, Ichikawa H, Kubo T, et al. The Japanese Society of Pathology Practical Guidelines on the handling of pathological tissue samples for cancer genomic medicine. Pathol Int. 2021;71(11):725–40.
14. Dufraing K, van Krieken JH, De Hertogh G, Hoefler G, Oniscu A, Kuhlmann TP, et al. Neoplastic cell percentage estimation in tissue samples for molecular oncology: recommendations from a modified Delphi study. Histopathology. 2019;75(3):312–9.
15. Betz BL, Post CS, Bergendahl J, Lefebvre N, Weigelin H, Brown NA. Optimization of Tumor Dissection Procedures Leads to Measurable Improvement in the Quality of Molecular Testing. J Mol Diagn. 2024;26(10):876–87.
16. Pearce J, Mann MK, Jones C, van Buschbach S, Olff M, Bisson JI. The most effective way of delivering a train-the-trainers program: a systematic review. J Contin Educ Health Prof. 2012;32(3):215–26.
17. Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. Genome Med. 2009;1(6):62.
18. Mikubo M, Seto K, Kitamura A, Nakaguro M, Hattori Y, Maeda N, et al. Calculating the Tumor Nuclei Content for Comprehensive Cancer Panel Testing. J Thorac Oncol. 2020;15(1):130–7.
19. Dufraing K, De Hertogh G, Tack V, Keppens C, Dequeker EMC, van Krieken JH. External Quality Assessment Identifies Training Needs to Determine the Neoplastic Cell Content for Biomarker Testing. J Mol Diagn. 2018;20(4):455–64.
20. Smits AJ, Kummer JA, de Bruin PC, Bol M, van den Tweel JG, Seldenrijk KA, et al. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. Mod Pathol. 2014;27(2):168–74.
21. Tissue-i assessment module [Available from: https://genqa.org/tissuei.
22. Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. Biochem Biophys Res Commun. 2000;271(3):726–30.
23. Vicente A, Bianchini RA, Laus AC, Macedo G, Reis RM, Vazquez VL. Comparison of protocols for removal of melanin from genomic DNA to optimize PCR amplification of DNA purified from highly pigmented lesions. Histol Histopathol. 2019;34(9):1089–96.
24. Parsons SD, Murphy K, Finall A. Assessing the Impact of Melanin Content on the Reliability of the Idylla™ BRAF Mutation Test. J Mol Pathol. 2023;4(4):307–17.

25. Jeong J, Kim D, Ryu YM, Park JM, Yoon SY, Ahn B, et al. Artificial intelligence algorithm for neoplastic cell percentage estimation and its application to copy number variation in urinary tract cancer. J Pathol Transl Med. 2024;58(5):229–40.
26. Lin S, Samsoondar JP, Bandari E, Keow S, Bikash B, Tan D, et al. Digital Quantification of Tumor Cellularity as a Novel Prognostic Feature of Non-Small Cell Lung Carcinoma. Mod Pathol. 2023;36(3):100055.
27. Azimi V, Chang YH, Thibault G, Smith J, Tsujikawa T, Kukull B, et al. Breast Cancer Histopathology Image Analysis Pipeline for Tumor Purity Estimation. Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging. 2017;2017:1137–40.
28. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. Oncotarget. 2012;3(5):546–58.
29. Steiert TA, Parra G, Gut M, Arnold N, Trotta JR, Tonda R, et al. A critical spotlight on the paradigms of FFPE-DNA sequencing. Nucleic Acids Res. 2023;51(14):7143–62.
30. Einaga N, Yoshida A, Noda H, Suemitsu M, Nakayama Y, Sakurada A, et al. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. PLoS One. 2017;12(5):e0176280.
31. Amirault K, Collins M, Beker L, Mills B, Werner M, Andreas J, et al. Fully automated extraction of high-quality total nucleic acids from FFPE specimens for comprehensive genomic profiling of solid tumors. SLAS Technol. 2025;31:100252.
32. Durvasula K, Chen J, Baggs J, Butts T. Comparison Analysis of Yield, Quality and Next Generation Sequencing from FFPE Samples Using Three Total Nucleic Acid Isolation Kits Omega Bio-tek, Inc2024 [Available from: https://omegabiotek.com/application-notes/comparison-analysis-of-yield-quality-and-next-generation-sequencing-from-ffpe-samples-using-three-total-nucleic-acid-isolation-kits/.
33. Dube S, Al-Mannai S, Liu L, Tomei S, Hubrack S, Sherif S, et al. Systematic comparison of quantity and quality of RNA recovered with commercial FFPE tissue extraction kits. J Transl Med. 2025;23(1):11.
34. Bonnet E, Moutet ML, Baulard C, Bacq-Daian D, Sandron F, Mesrob L, et al. Performance comparison of three DNA extraction kits on human whole-exome data from formalin-fixed paraffin-embedded normal and tumor samples. PLoS One. 2018;13(4):e0195471.
35. Ottestad AL, Emdal EF, Gronberg BH, Halvorsen TO, Dai HY. Fragmentation assessment of FFPE DNA helps in evaluating NGS library complexity and interpretation of NGS results. Exp Mol Pathol. 2022;126:104771.
36. Infinium HD FFPE QC Assay Protocol [Available from: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/infinium_assays/infinium_hd_ffpe_qc_assay/infinium_ffpe_dna_qc_assay_insert_15020981_c.pdf.
37. Matsubara T, Soh J, Morita M, Uwabo T, Tomida S, Fujiwara T, et al. DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. Biomed Res Int. 2020;2020:9349132.

# Vedlegg

- Vedlegg 1: Prosjektdeltakere
- Vedlegg 2: Fremdrifts- og milepælsplan
- Vedlegg 3: Spørreskjema
- Vedlegg 4: Begrepsbibliotek

- Vedlegg 5: Oversikt over ekstraksjonskit
- Vedlegg 6: Kvalitetsparametere for vurdering av en sekvensering
- Vedlegg 7: Resultat av spørreskjema

## Vedlegg 1: Prosjektdeltakere

| Rolle | Navn | RHF | HF | Kommentar |
|---|---|---|---|---|
| Prosjektleder – fase 1 | Hong Yan Dai | Helse Midt – Norge | St. Olavs hospital | Molekylærbiolog |
| Prosjektleder – fase 2 | Annette Alte | Helse Sør – Øst | AHUS | Spesialbioingeniør M.Sc |
| Prosjektleder – fase 2 | Jon Andreas Lorentzen | Helse Vest | SUS | Molekylærbiolog |
| Prosjektleder – fase 2 | Kristin Dahl-Michelsen | Helse Vest | HUS | Molekylærbiolog |
| Prosjektleder – fase 2 | Rita Slettebø | Helse Vest | HUS | Fagbioingeniør |
| Gruppemedlem | Betty Furulund | Helse Nord | NLSH | Molekylærbiolog |
| Gruppemedlem | Geir Andre Kongelf | Helse Sør – Øst | OUS | Ingeniør |
| Gruppemedlem | Hanna Røgenes | Helse Sør – Øst | OUS | Spesialbioingeniør, M.Sc |
| Gruppemedlem | Hanne Skarpodde Sæther | Helse Sør – Øst | SØHF | |
| Gruppemedlem | Julie Staurseth | Helse Sør – Øst | STHF | Molekylærbiolog, M.Sc |
| Gruppemedlem | Mahsa Fakhraee | Helse Sør – Øst | SSHF | Molekylærbiolog |
| Gruppemedlem | Odd- Erik Bakkebø | Helse Nord | UNN | Molekylærbiolog |
| Gruppemedlem | Veronica Skarpeteig | Helse Midt – Norge | St. Olavs hospital | Spesialbioingeniør, M.Sc |
| Gruppemedlem | Vi Nguyen | Helse Sør – Øst | OUS | Forskningsstøtte |
| Gruppemedlem | Silje Hansen | Helse Sør – Øst | OUS | Forskningsstøtte |
| Gruppemedlem | Cecilie Bendigtsen Schirmer | Helse Sør – Øst | OUS | Spesialbioingeniør |
| Prosjektstøtte | Olga Nævisdal | Helse Sør – Øst | NorPreM | Prosjektkoordinator |
| Referansegruppe | Patologi avd. inkl. lab | Alle | | |

## Vedlegg 2: Fremdrifts- og milepælsplan

| Når | Hva | Hvor | Leveranse |
|---|---|---|---|
| **05.03.2024** | Oppstartsmøte for ekstraksjonsprosjektet | Teams | Arbeidsgruppe opprettet. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | Spørreskjema utformes med mulighet for innspill fra prosjektgruppen. |
| **15.04.2024** | Spørreskjema sendes ut | Mail | Spørreskjema sendt ut til alle laboratorier som utfører NGS på FFPE-materiale. Svarfrist: 30.04.2024. |
| **26.04.2024** | Gjennomgang av spørreskjema | Teams | Presentasjon av resultater fra spørreskjema. Fordelt oppgaver i prosjektgruppen. |
| **15.05.2024** | Planleggingsmøte | Teams | Program for 22.mai møte vedtatt. |
| **22.05.2024** | Møte på Gardemoen | Fysisk møte Oslo | Presentasjon av spørreundersøkelsen, diskusjon rundt resultatene. |
| **21.06.2024** | Oppfølgingsmøte etter Gardemoen | Teams | Utkast til rapport skrevet av Hong Yan Dai. Opprettet skrivegruppe. |
| **22.08.2024** | Møte med skrivegruppen | Teams | Diskuterte rapportoppsett. Fordelte arbeidsoppgaver. |
| **12.09.2024** | Møte med skrivegruppen | Teams | Diskuterte utfordringer og begrensninger med rapporten. |
| **26.09.2024** | Møte med ekstraksjonsgruppen | Teams | Innspill til rapport fra gruppen. Planlagt nytt fysisk møte for å utarbeide konklusjon og eventuelle nasjonale anbefalinger. |
| **31.10.2024** | Møte med skrivegruppen | Teams | Planlagt agenda for fysisk møte 07.11.2024. |
| **07.11.2024** | Nytt fysisk møte på Gardemoen | Fysisk møte Oslo | Gjennomgang av rapport og utarbeiding av utkast av nasjonale retningslinjer. |
| **22.01.2025** | Møte med ekstraksjonsgruppen | Teams | Gjennomgang av rapport og tildele ansvar for litteratursøk. |
| **12.02.2025** | Møte med skrivegruppe | Teams | Integrere prosjektgruppens arbeid med litteratur i rapport. Tildele nye oppgaver til prosjektgruppe. |
| **05.03.2025** | Møte med ekstraksjonsgruppen | Teams | Gjennomgang av anbefalinger og avtale om fysisk møte. |
| **25.03.2025** | Møte med skrivegruppe for planlegging av fysisk møte | Teams | Organisere rapport og fordeling av oppgaver til fysisk møte. |
| **02.04.2025** | Fysisk møte på Gardemoen | Fysisk møte Oslo | 3 arbeidsgrupper har jobbet med rapportskriving og anbefalinger. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **08.05.2025** | Møte med ekstraksjonsgruppen | Teams | Ferdigstilling av rapport. |
| **21.05.2025** | Møte med ekstraksjonsgruppen | Teams | Godkjenne endelig rapport. |
| **29.05.2025** | Utkast sendt til høring av prosjektgruppen | Mail | Prosjektgruppen gir tilbakemeldinger på rapporten |
| **18.06.2025** | Møte med skrivegruppen | Teams | Gjennomgang av tilbakemeldinger fra prosjektgruppen. |
| **25.08.2025** | Utkast sendt til høring av referansegruppe | Mail | Frist for innspill: 15.09.2025 |
| **10.09.2025** | Prosjektet presentert på NITO Grunnkurs i Patologi | Fysisk | Presentasjon |
| **18.09.2025** | Møte med skrivegruppen | Teams | Plan for bearbeiding av innspill og utforming av ingress. |
| **20.10.2025** | Rapport presentert på det interregionale fagdirektormøte | Teams | Presentasjon |
| **22.10.2025** | Rapport presentert for UMP | Teams | Presentasjon |
| **28.10.2025** | Rapport presentert for arbeidsutvalget i NorPreM | Teams | Presentasjon |
| **Okt-des 2025** | Møter skrivegruppen | Teams | Ferdigstilling av rapport |

## Vedlegg 3: Spørreskjema

**Kartlegging av praksis av kvantifisering og kvalitetskontroll av input DNA/RNA fra FFPE tumorvev til NGS analyse**

1. Helseregion
2. Helseforetak
3. Navn på utførende laboratorium

### Del 1: Preanalytisk

1. Har dere oversikt over hvilke fiksativ rekvirentene bruker?
2. Sender dere ferdige utfylte prøverør til alle rekvirenter?
3. Om dere sender ferdige utfylte prøverør til rekvirenter, fra hvilken produsent?
4. Har de som isolere DNA/RNA tilgang på data om total fikseringstid?
5. Om de som isolerer DNA/RNA har tilgang på data om total fikseringstid, hvordan bruker de denne informasjonen, og hvilken kjemi er brukt i denne prosessen?
6. Har de som isolere DNA/RNA tilgang på informasjon om ev. forbehandling av materialet? (f.eks. dekalsinering)

7. Om de som isolerer DNA/RNA har til gang på informasjon om forbehandling av materialet, hvordan benytter de seg av denne informasjonen?
8. Hvilken type dekalsineringsløsning bruker dere?
9. Hvilken type parafin bruker dere?
10. Hvordan og hvor lenge blir parafin blokkene lagret? Spesielle temperatur?
11. Har dere min. og max. tid for standardisering av fikseringstid for nålebiopsier?
12. Har dere min. og max. tid for standardisering av fikseringstid for større preparat?

**Del 2: Utvalg av materialet**

1. Hvem markerer snittene?
2. Blir markering av snitt gjort digitalt eller på snittene?
3. Minimumskrav for andel tumorceller
4. Beregner dere areal x tumorceller for å se om det er nok materialet?
5. Fjernes parafin ved små biopsier for å ikke influere ekstraksjon ved bruk av xylen?
6. Isolerer dere DNA/RNA fra materialet, selv om tumor materialet inneholder nekrose
7. Utfører dere makrodisseksjon?
8. Ved utvalg av materiale til analysen, bruker dere leverandørens betingelser for tumorprosent?
9. Hvilke typer standarder (begrensninger) har dere på hvor gammelt FFPE materialet kan være ved utvalg av materialet?
10. Benytter dere kontrollsnitt (HE-snitt) før og etter snitt til isolering av nukleinsyrer?
11. Hvilke kit bruker dere til DNA-isolering?
12. Hvilke kit bruker dere til RNA-isolering?
13. Angi hvilken metode som benyttes når det er for lite tumorvev
14. Vurderes grad av nekrose i forhold til resultat og fragmentering?
15. Angis vevskvalitet og mengde betennelses celler i vevet (som kan maskere og gi en falsk høy DNA konsentrasjon/feil fortynning og input av tumormengde i NGS)?

**Del 3: Isolering DNA/RNA**

1. Bruker dere spektrofotometer til konsentrasjonsmåling av DNA/RNA?
2. Om dere bruker spektrofotometer til konsentrasjonsmåling av DNA/RNA, hvilket instrument bruker dere?
3. Sjekker dere fragmentering av DNA/RNA?
4. Bruker dere Bioanalyzer/ TapeStation eller annet utstyr for å sjekke fragmenteringsgrad av DNA/RNA?
5. Bruker dere kommersielle kit for å sjekke fragmenteringsgrad av DNA/RNA?
6. Følger dere det som står i protokollen når det gjelder input av mengde DNA/RNA?
7. Minste nødvendige DNA-konsentrasjon for input i sekvensering og input i library prep. Hvor stengt følges denne grensen?
8. Minste nødvendige RNA-konsentrasjon for input i sekvensering og input i library prep. Hvor stengt følges denne grensen?
9. Hva er minimum krav for DNA input (ng) for NGS library prep?
10. Hvilken metode blir benyttet når DNA er fragmentert eller ved for lav DNA input?

11. Hvilken metode blir benyttet når RNA er fragmentert eller ved for lav RNA input?
12. Hvilke NGS-paneler benyttes ved deres lab?

**Del 4: Biblioteksprep/sekvensering**

1. Hvilken sekvenseringsplattform benyttes?
2. Ved bruk av Ion Torrent sekvenseringsplattform, er Genexus Systemet tatt i bruk?
3. Hvilke kvalitetsparametere benyttes for vurdering av den enkelte prøve før sekvensering?
4. Har dere en nedre grense ift. fragmentering av DNA/RNA?
5. Om det er en nedre grense ift. fragmentering av DNA/RNA, spesifiser.
6. Hvordan utføres library prep.?
7. Måler dere konsentrasjon av biblioteket?
8. Har dere kvalitetsparametere for biblioteket?
9. Hvilke kvalitetsparametere har dere for biblioteket?
10. Hvilken grense benyttes for grad av polyklonalitet i NGS-oppsett?
11. Hvilken grense benyttes for sekvenseringsdybden til prøven og mapped reads på DNA/RNA?
12. Hvordan dokumenteres og rapporteres avvikende DNA/RNA-kvalitet hos dere? Følges dette opp med tiltak og vurderes årsaker? Evt. hvem gjør dette?
13. Hva var grunnen til at et visst antall NGS-prøver ikke ble besvart i 2023 (ikke IMPRESS studiet)?
14. Spesifiser antall prøver som ikke ble besvart i 2023

Generelle kommentarer/innspill til kartleggingsundersøkelsen

## Vedlegg 4: Begrepsbibliotek

| Begrep/ forkortelse | Forklaring |
|---|---|
| CNV | Copy number variation – Kopitallsvariasjon. |
| DNA | Deoksyribosenykleinsyre – arvemateriale. |
| EDTA | Etylendiamintetraacetat – Kjemikalie som benyttes for å mykne hardt vev slik at dette kan skjæres med mikrotom. |
| FFPE-vev | Formalinfiksert parafininnstøpt vev. |
| FISH | Fluoresence in situ hybridisering. |
| HE-snitt | Snitt farget med hematoksylin-eosin (HE) for å gi cellene farge; cellekjernene er mørkblå, cytoplasma og bindevev lysere rosa-fiolett. |
| hGE | Humant genom ekvivalent. |
| IVD | In-vitro diagnostisk. |
| MAPD | Median av alle parvise forskjeller for hver prøve i sekvenseringen. Kvalitetsmål som estimerer coverage variasjon mellom nærliggende amplikons ved analyse av CNV og coverage. MAPD er også et estimat på coverage støy på tvers av alle amplikoner på DNA nivå, og vil være høy ved en eventuell sterk fragmentering til stede. |
| NFMP | Norsk forening for molekylærpatologi. |

| | |
|---|---|
| NGS | Next generation sequencing som er en multiparallell dypsekvensering. |
| NO CALL | Et hvert variantfunn som ikke møter visse krav blir satt til NO CALL. Dette representerer sekvenserings problem som for eksempel mye støy og lav sannsynlighet for riktig basecalling for mutasjoner (Phred QC score), strand bias mellom fwd/rev strand, for lav coverage og eller for stor variasjon mellom amplikoner for kopitalls vurderinger (MAPD<br>for dårlig). |
| PCR | Polymerasekjedereaksjon - en metode som brukes for å amplifisere DNA/RNA. |
| Phred QC score | Et kvalitetsmål for hver mutasjon (substitusjon, insersjon, delesjon) som angir intergral av sannsynlighet for at p verdi viser korrekt base calling. |
| PK | Proteinase K. |
| QC | Quality controls- Kvalitets parametre under sekvensering. |
| qPCR | Kvantitativ polymerase chain reaction. |
| RNA | Ribonukleinsyre. |
| ssDNA | Singel-stranded DNA- enkeltrådet DNA. |
| UDG | Uracil-DNA-glykosylase. |
| UMP | Undernettverk for molekylærpatologi. |
| UMI | Unike molekylære indekser. |
| WT | Villtype normal, ikke mutert gen. |

## Vedlegg 5: Oversikt over ekstraksjonskit

| Leverandør | Ekstraksjonskit - DNA | Ekstraksjonskit - RNA |
|---|---|---|
| Qiagen | QIAamp DNA FFPE tissue kit, EZ1 FFPE DNA kit, Allprep FFPE DNA/RNA, QiaCube Allprep DNA/RNA/miRNA | RNAeasy FFPE Kit |
| Promega | Maxwell Purification Plus FFPE kit, Maxwell RSC DNA FFPE Kit og Maxwell RSC Tissue DNA Kit | Maxwell RSC RNA FFPE Kit, Maxwell RSC simply RNA Tissue |
| Thermo Fisher | RecoverAll, Ion Torrent Genexus FFPE DNA/RNA Purification kit | |
| Omega | E.Z.N.A Tissue DNA kit | E.Z.N.A RNA kit |
| Bioservices | DNA purification kit- MagLead | |
| BioSite | | Quick-RNA FFPE MiniPrep, Zymo Research |

## Vedlegg 6: Kvalitetsparametere for vurdering av en sekvensering

| QC Parametre sjekkes om tilstrekkelig verdier * | Genexus paneler | Ion Torrent Comprehensive paneler | Oncomine Assay Pluss_*** | Illumina TSO500 *** |
|---|---|---|---|---|
| | | DNA: | | |
| Histogram (fragmentering/nok mean bp) | X | X | X | X |
| Total mapped reads (mapped reads) | X | X | X | Cluster density/ passing filter X |
| Dybde (depth/average base coverage depth) | X | X | X | X |
| Lite NO CALL | X | X | X | |
| Lite lavfrekvente deamineringer** | X | X | ** (avh av mutasjon profil) | ** (avh av mutasjon profil) |
| Lite varierende eller høy coverage på referanse områder bak filteret hos de fleste gener i analysepakke | X NEGATIV/REF områder | X REF områder | X REF områder | X |
| Høy uniformity/lav MAPD | X | X | X | |
| In-line kontroll (fragment str. -fragmenteringsgrad og ratio- mengde) | X | | | |
| | | RNA: | | |
| Histogram (fragmentering/nok mean bp) | X | X | X | X |
| Total mapped fusion reads (mapped fusion reads) | X | X | X | |
| Ekspresjonskontroller | X | X | X | |

*- for verdier og mer forklaring, se tolkegruppe sin oversikt over QC parametere.

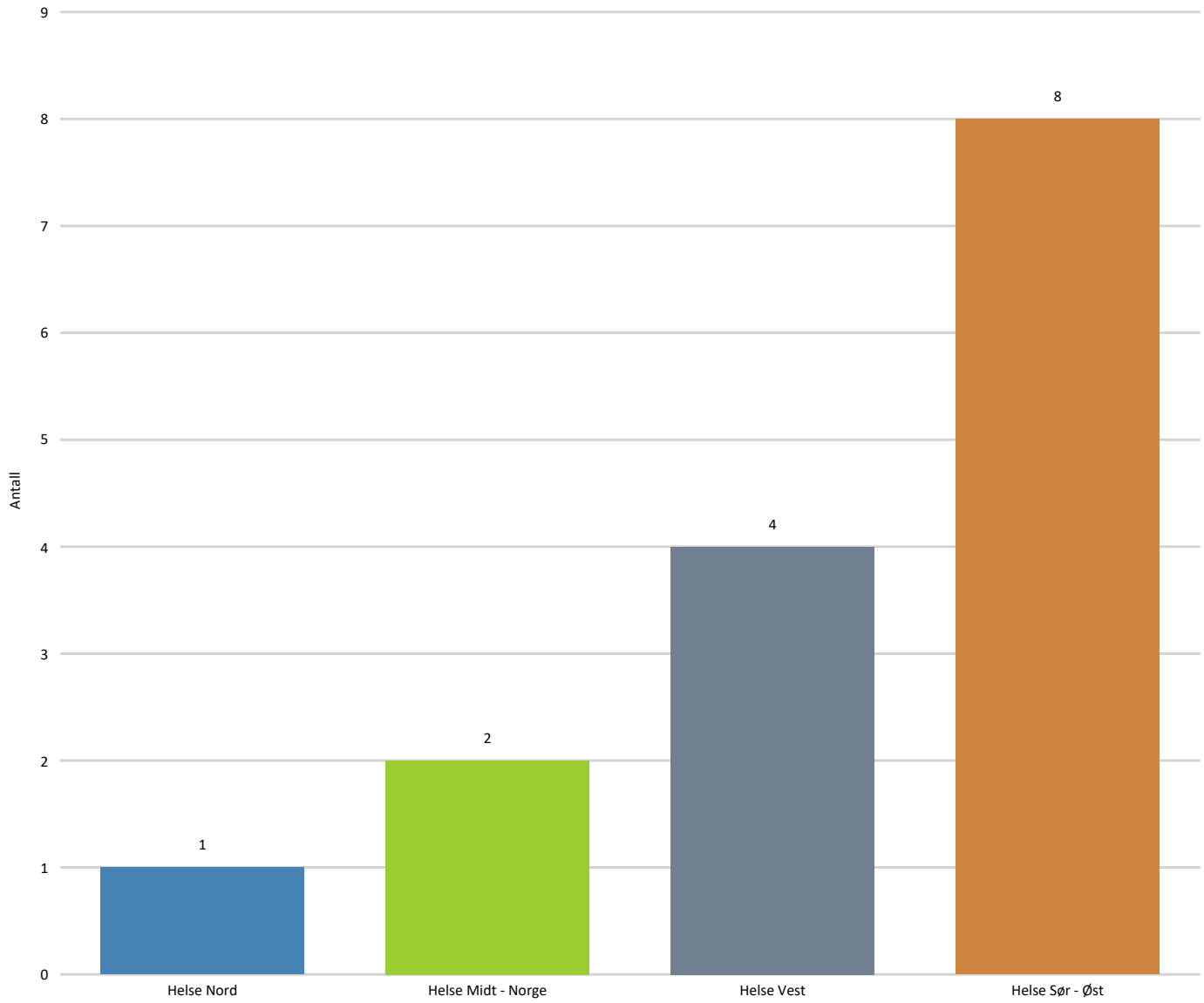
**- dersom ikke Uracyl-N-Glycosylase (UNG) enzym benyttes.

***-panel har i tillegg andre større biomarkører som må vurderes, se tolkingsveileder.

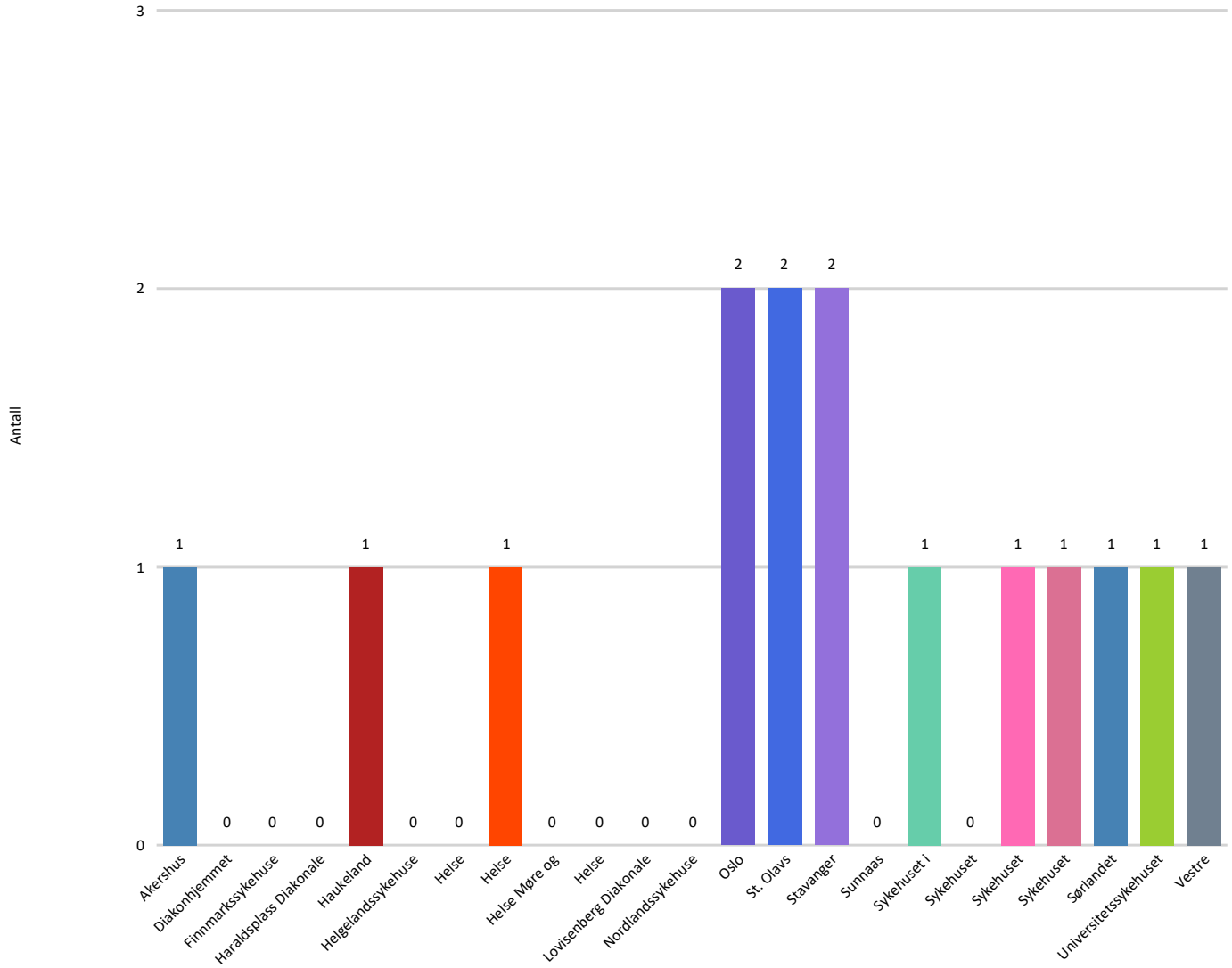
## Vedlegg 7: Resultat av spørreskjema

# Kartleggingsundersøkelsen: praksis av kvantifisering av kvalitetskontroll av input DNA/RNA fra FFPE tumorvev til NGS analyse

## 1. Din helseregion



## 2. Ditt helseforetak

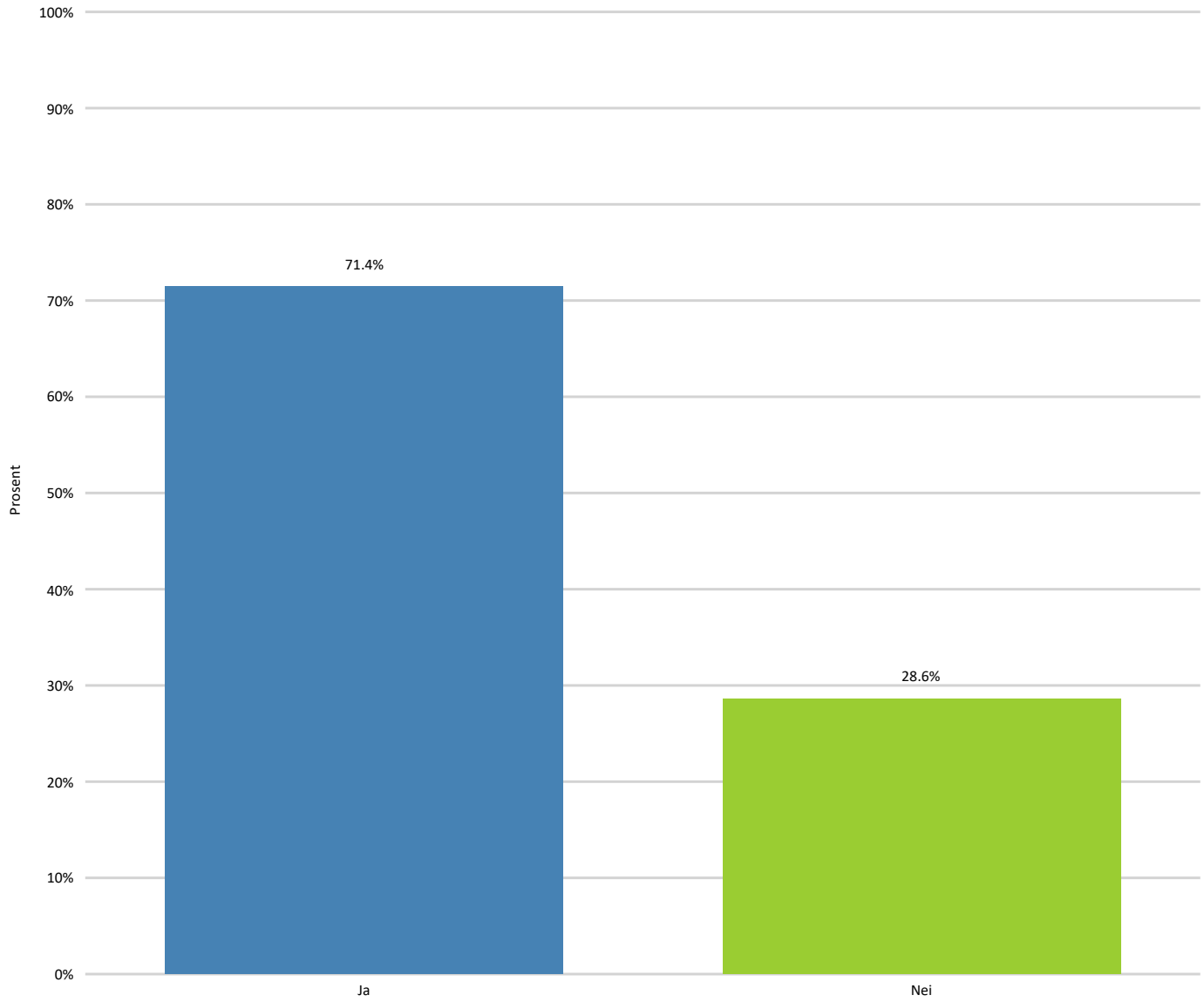


## 3. Utførende laboratoriet

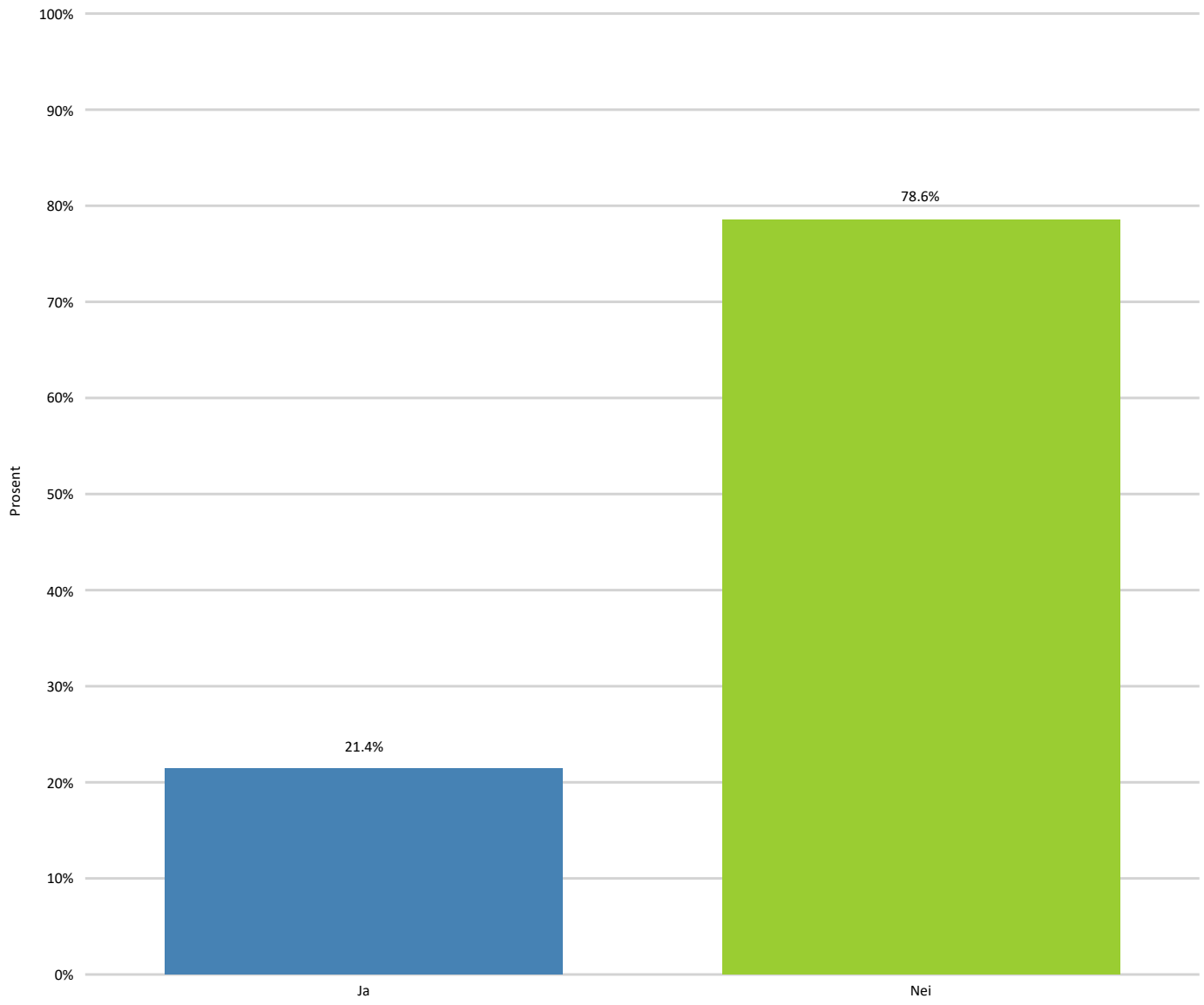
| Svar |
| --- |
| Molekylærpatologi, Vestre Viken Drammen sykehus |
| Avdeling for patologi |
| Seksjon for genteknologi |
| Avdeling for Patologi |
| Mikrobiologisk avdeling, seksjon for infeksjonsserologi og molekylærdiagnostikk |
| Patologi |
| Avdeling for patologi og seksjon for medisinsk genetikk |
| Seksjon for Kvantitativ og molekylær patologi |
| Seksjon for molpat, avdeling for St.Olav hospital |
| Avdeling for patologi og Kreftgenomikk |
| Enhet for forskningsstøtte |
| Klinisk patologi, Spesialanalyser |
| Enhet for studierelatert diagnostikk |
| Seksjon for Molekylær patologi og forskning, Patologi, Akershus universitetssykehus |
| Patologi |

Denne undersøkelsen har 4 deler med 12 - 15 spørsmål i hver del:Preanalystiske prosesserUtvalg av materialetIsolering DNA/RNABiobliotekspreп/sekvenseringDel 1:Preanalytiske prosesser

## 4. Har dere oversikt over hvilke fiksativ rekvirentene bruker?



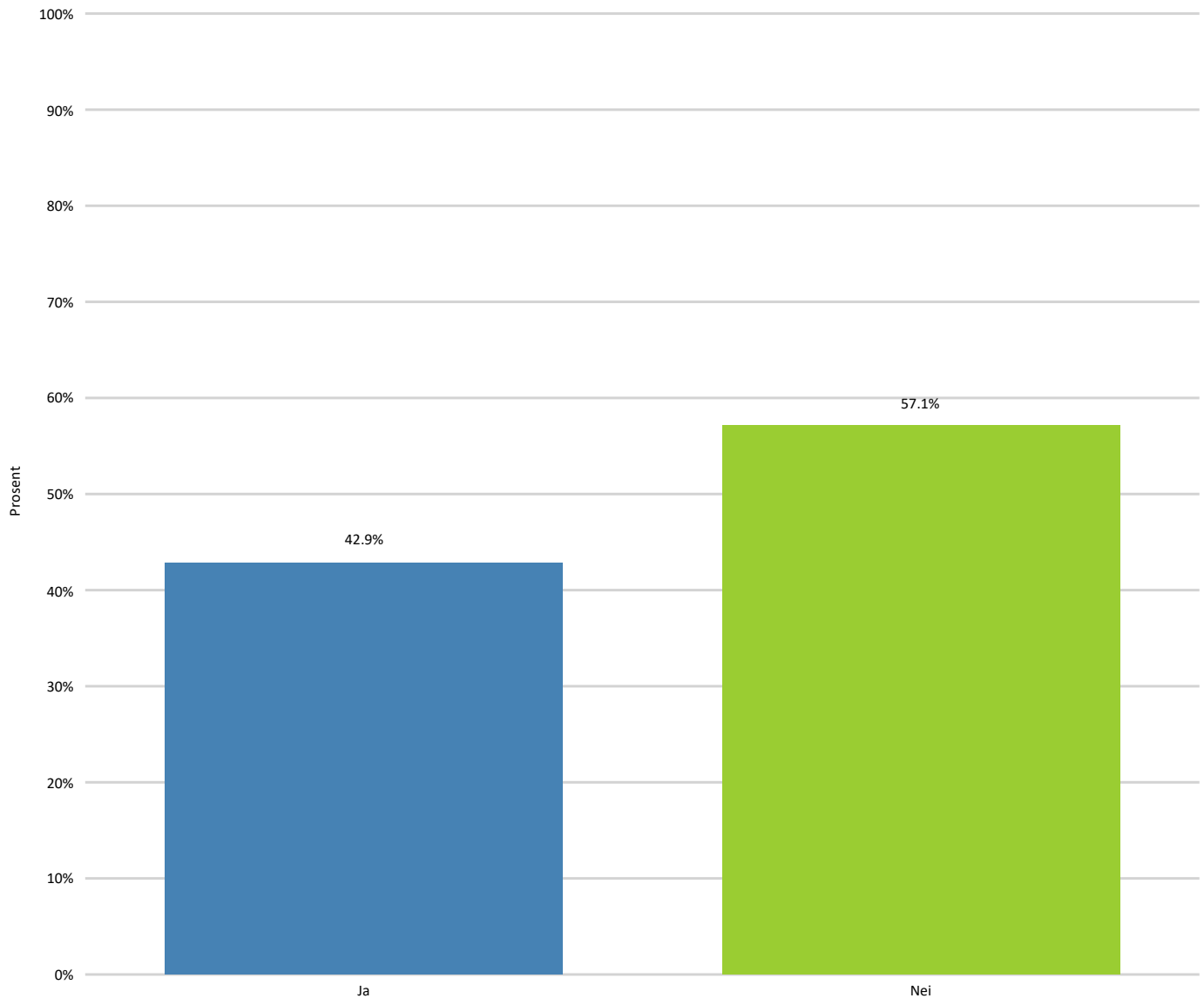
## 5. Sender dere ferdige utfylte prøverør til alle rekvirenter?



## 6. Om dere sender ferdige utfylte prøverør til rekvirenter, fra hvilken produsent?

| Svar |
| --- |
| Histolab |
| Histolab |

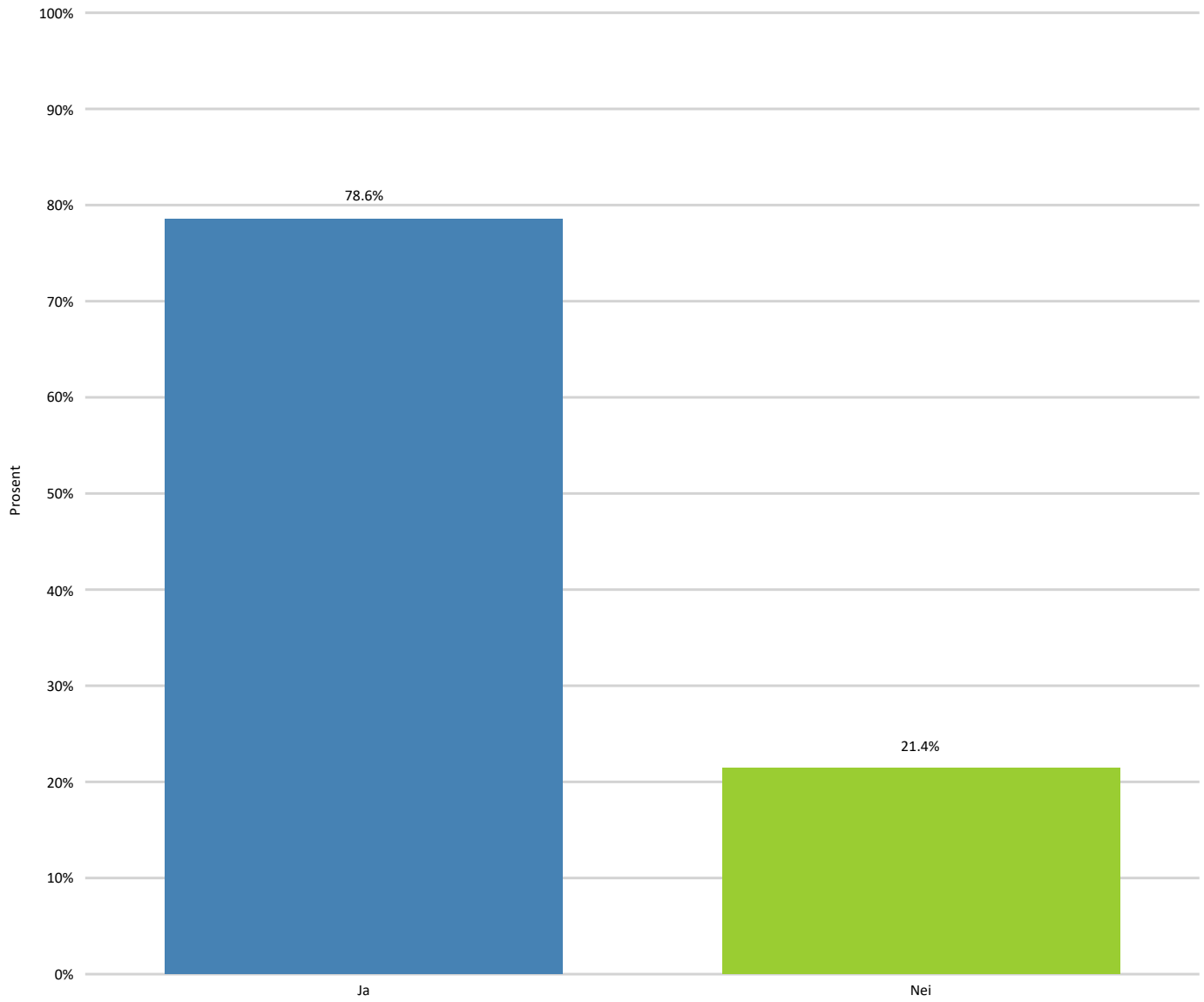
## 7. Har de som isolere DNA/RNA tilgang på data om total fikseringstid?



## 8. Om de som isolerer DNA/RNA har tilgang på data om total fikseringstid, hvordan bruker de denne informasjonen og hvilket kjemi er brukt i denne prosessen?

| Svar |
| --- |
| Ved utfordringer/feil på prøven kan de gå tilbake og se på fikseringstid |
| Det står ikke oppført spesifikk fikseringstrid, men tiden kan estimeres basert på prøvedato, mottatt-dato og logg. Fikseringstiden endrer ikke måten prøven behandles på ved DNA/RNA isolering. |
| Brukes ikke i dag |
| Kun i forbindelse med analyse og feilsøking. Relevant ved dårlig DNA/RNA kvalitet. Vi har tilgang til data/kjemi i prosessen i avdelingen. |
| Kun dersom prøve resultat ikke viser tilfredstillende resultat utføres det feilsøking i labdata systemene som registerer total fikseringstid og det meldes evt avvik. |
| Brukes i feilsøking dårlig kvalitet. |

## 9. Har de som isolere DNA/RNA tilgang på informasjon om ev. forbehandling av materialet (f. eks. dekalsifisering?)



## 10. Om de som isolerer DNA/RNA har til gang på informasjon om forbehandling av materialet, hvordan benytter de seg av denne informasjonen?

| Svar |
| --- |
| Ved dekalsinering so påvirker DNA/RNA angis dette som kommentar i svarrapport |
| Denne informasjonen ligger i LIS på hver enkelt prøve. |
| Som veiledende informasjon når vi ser på kvaliteten av DNA/RNA |
| VI bruker snitt direkte i Idylla-kassettene. ikke ekstraksjon per i dag. |
| Det sees opp mot QC-parametere og kommenteres evt. i svarrapport. |
| ja.  Bruk det som kontroll i tilfelle det blir lite og fragmentert DNA. |
| Patolog velger i størst mulig grad materiale som ikke er dekalsinert |
| Brukes postanalytisk ved feilsøking. |
| Vi benytter oss ikke av denne informasjonen, med mindre det er særlig relevant. |
| De som isolerer DNA/RNA utfører også hele wet lab og tolking, så de får tilgang til alle forhold som kan påvirke prøveresultatet. Også ved å søke i LVMS labdata system, evt DIPS. Vi benytter det ved feilsøking ved dårlig kvalitet og NGS resultat for riktig utsvaring. |
| Tas med i tolking |

## 11. Hvilken type dekalsifiseringsløsning bruker dere?

| Svar |
| --- |
| fram til 2022 maursyre<br>Fra 2022 EDTA |
| EDTA på beinmarg, salpetersyre på annen beinvev |
| Dekalsineringsvæske i 2L kanner. Inneholder 10%Saltsyre fra Chemi Teknik. Det er en prosess i gang for å bytte denne. |
| Dekalsineringsvæske fra Chemi-teknik |
| Til små biopsier brukes Mol Decal 10 (ready to use solution). Til store preparater brukes 20% maursyre |
| Osteosoft, Osteomoll en sjelden gang ved svært hardt materiale (ødelegger DNA) |
| Egenprodusert EDTA-løsning, pH 7 som standard dekalsifiserig av beinmarg. På større beinbiter bruker vi 5% HNO3 eller 10% HNO3 (kun etter avtale med patolog). |
| EDTA-dekalsineringsvæske |
| EDTA (standard), maursyre og saltsyre kommenteres stort sett. Dekalsinering benyttes ved harde bein, type dekalsinering avhengiger av beintetthet. |
| Ikke relevant |
| EDTA eller HCl |
| Ikke relevant |
| Vi har ikke etablert EDTA som dekalsifiseringsløsning ved skjelett metastaser, men dette er i planene framover. Per idag er det maursyre som benyttes og følgelig blir prøven fragmentert, men av og til detekteres varianter av behandlingskonsekvens til tross for det. |
| Manuell prosess, rdo. På vei til å skifte til meir edta basert. |

## 12. Hvilken type parafin bruker dere?

| Svar |
| --- |
| Parafinvoks fra Chemi- Teknik |
| Histowax |
| QPATH fra VWR |
| Histowax fra Histolab og Sakura |
| Vi bruker Tissue-Tek Paraform Processing/ Embedding Medium, Formula 3 |
| Histowax |
| Vi bruker Histowax. Produsent er Histolab. |
| paraform |
| Histolab og Sakura (fremføringsmaskin) |
| Parafinblokkene vi ekstraherer fra, er blokker vi ikke har fremført og støpt selv. Men vi bruker parafin fra Histolab. |
| Paraffin Histowax (kat.nr.: 200346) |
| Vet ikke. |
| Parafinvoks Cellwax Plus |
| Sakura |

## 13. Hvordan og hvor lenge blir parafin blokkene lagret? (spesielle temperatur)

| Svar |
| --- |
| Romtemperatur<br>vegres for alltid siden 1976 |
| Blir lagret til evig tid i romtemperatur |
| Romtemperatur |
| De blir lagret for alltid i romtemperatur |
| Parafinblokkene oppbevares i romtemperatur i arkivskuffer i uendelig tid. |
| For alltid, ved romtemperatur |
| Parafinblokkene blir lagret «for alltid». Vi har blokker fra 1976. Vi har kjøling i rommet der blokkene lagres, temp 14-15 grader. |
| Rom temperatur (RT); evig. |
| Lagres ved romtemperatur i evig tid. Begrensinger mtp alder av arkivert blokk for molekylære analyser. |
| Ikke relevant |
| For alltid i romtemperatur |
| Romtemperatur, til evig tid. |
| Romtemperatur i egne metall skap. |
| Romtemp evig tid |

## 14. Har dere min. og max. tid for standardisering av fixeringstid for nålebiopsier?

| Svar |
| --- |
| Min. tid 24 Max. tid 48 |
| Min. tid 12 timer Max. tid 2 døgn |
| Min. tid 16-24 timer Max. tid |
| Min. tid 6t Max. tid 24t |
| Min. tid 6,5 timer Max. tid<br>Minimums fixeringstid for nålebiopsier og andre små biopsier (f.eks gastrobiopsier) er 6,5 timer. Det er et problem at rekvirent ikke alltid skriver på rekvisisjonen når prøven er tatt (klokkeslett). Vi har ikke noe standarsiert max.tid, men vi unngår så langt det lar seg gjøre at biopsiene ligger lenger enn nødvendig til fiksering. |
| Min. tid Max. tid |
| Nei |
| Min. tid 24 timer Max. tid: Mål om 3 døgn, men kan bli opp til 5-6 døgn ved helligdager. |
| Min. tid : 2 timer Max. tid |
| Min. tid : 24 timer Max. tid: 3 dager ved helg |
| Min. tid Max. tid<br>Nei |
| Min. tid Max. tid<br><br>Normalt sett ett døgn, men noe variasjon i henhold til preparatets størrelse og vevstype (jo mer protein/fett, desto lengre tid). |
| Min. tid Max. tid |
| Min. tid 24t Max. tid 72t ift. mammacancer og ISH HER2 i følge prosedyre |
| Min. tid Max. tid<br>6-12 timer |

## 15. Har dere min. og max. tid for standardisering av fixeringstid for større preparat?

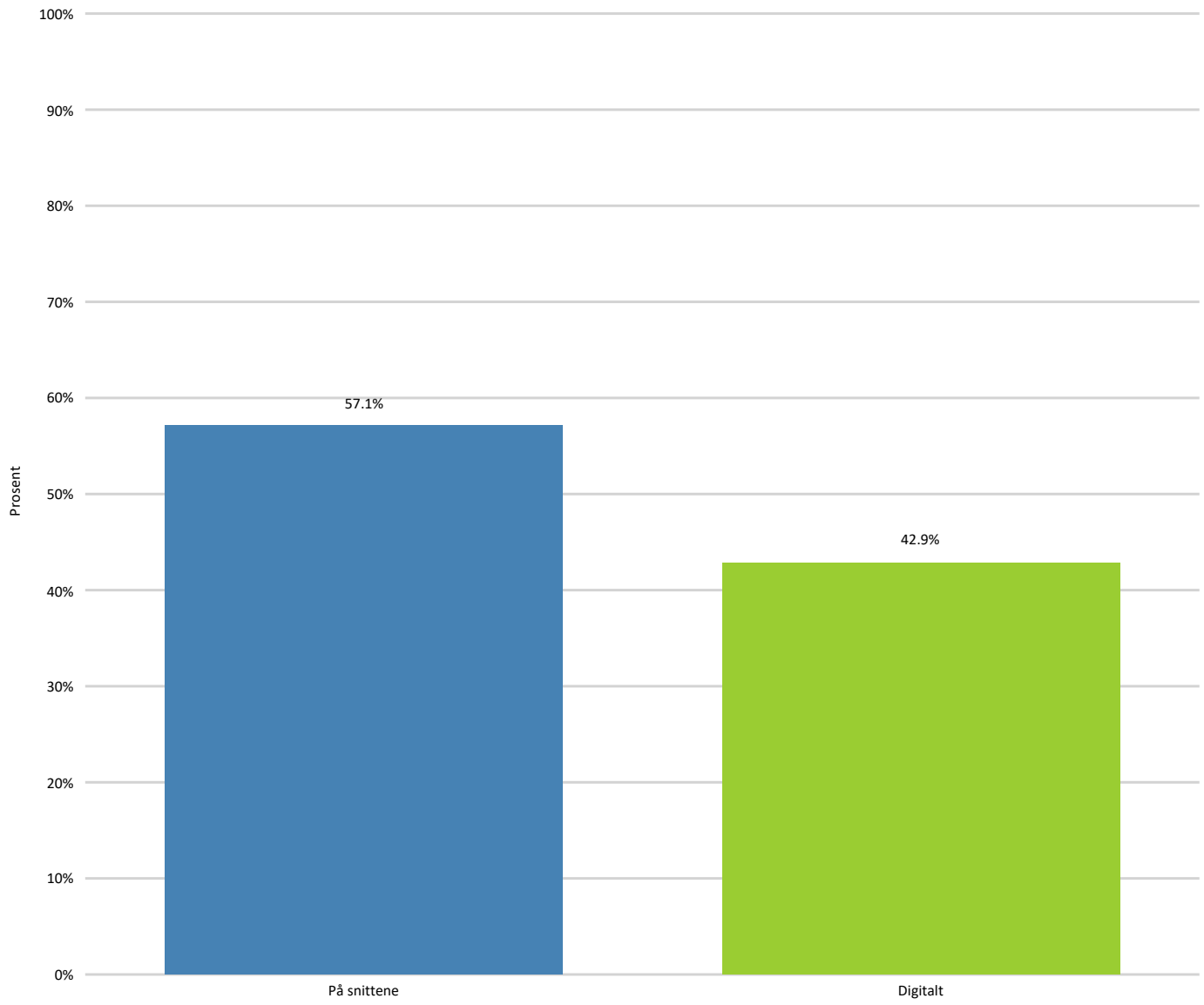
| Svar |
| --- |
| Min. tid 48 Max. tid 1 uke |
| Min. tid 24 timer (mer på noen preparat) Max. tid en uke |
| Min. tid 48 timer Max. tid |
| Min. tid 24t Max. tid 3-4 dager |
| Min. tid 3 timer Max. tid<br>Større preparater ligger minimum 3 døgn til fiksering, noen ganger mer. Ved behov legges ferdig beskjærte blokker til etterfiksering. Det er ikke standariserte min./maks. tid. |
| Min. tid Max. tid<br>Nei |
| Min. tid: 2 døgn Max. tid: Ingen fastsatt makstid |
| Min. tid Max. tid |
| Min. tid : 3-5 dager (avhengig av organtype) Max. tid: 2-3 uker (ved unntak) |
| Min. tid Max. tid<br>Nei |
| Min. tid Max. tid<br><br>Avhengig av preparatets størrelse og type vev. |
| Min. tid Max. tid |
| Min. tid 48 t Max. tid I.A. , lager på forhånd hjelpesnitt for at fomalin trenger gjennom eller skifte formalin etter 1 døgn ved mest blodige preparater |
| Min. tid Max. tid<br>24-48 timer større biopsi, meir for store makropreparat. |

Del 2: utvalg av materiale

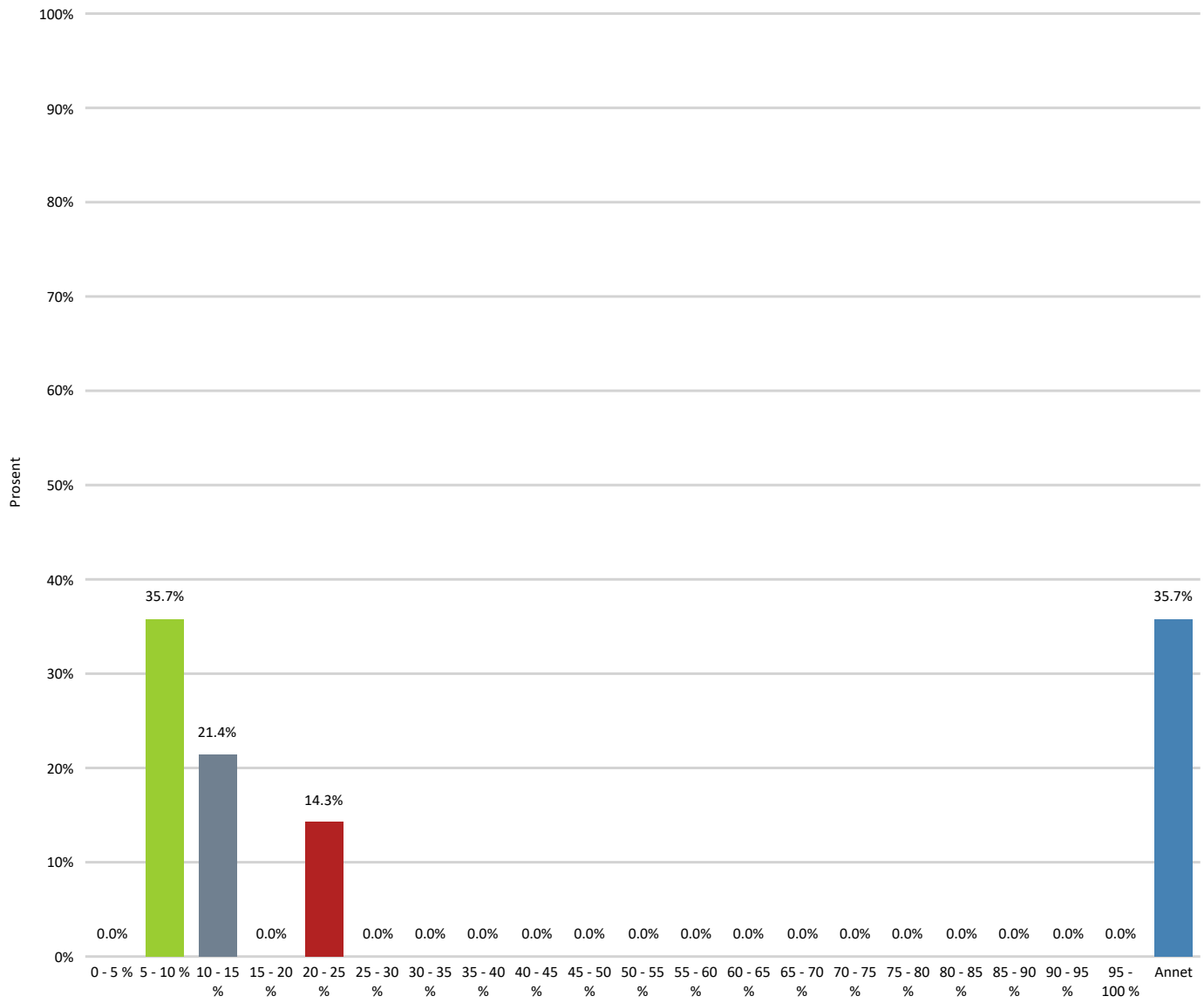
## 16. Hvem markerer snittene?

| Svar |
| --- |
| Preparat ansvarlig overlege |
| Patolog. Markerer digitalt i de fleste tilfeller, men på noen analyser ønsker lab at fysiske snitt blir markert |
| Patologene |
| SlideMate |
| Patologer |
| Patolog |
| Patolog |
| Patologer, merker enten på snitt el digitalt på skannet bilder. |
| patolog |
| Patologene eller rekvirent. |
| Patolog |
| Patolog |
| Patologene |
| Patolog |

## 17. Blir markering av snitt gjort digitalt eller på snittene?

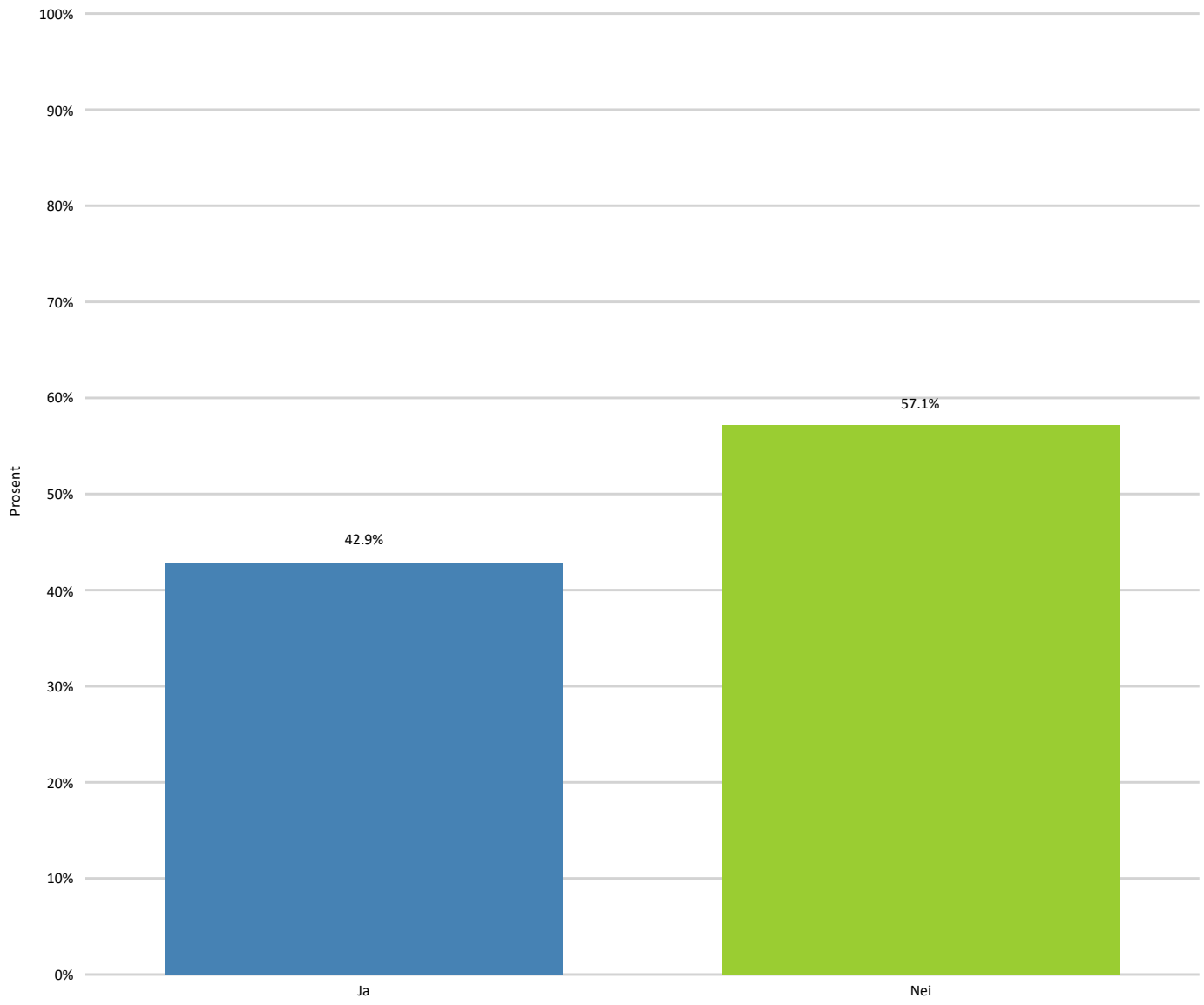


## 18. Minimumskrav for andel tumorceller

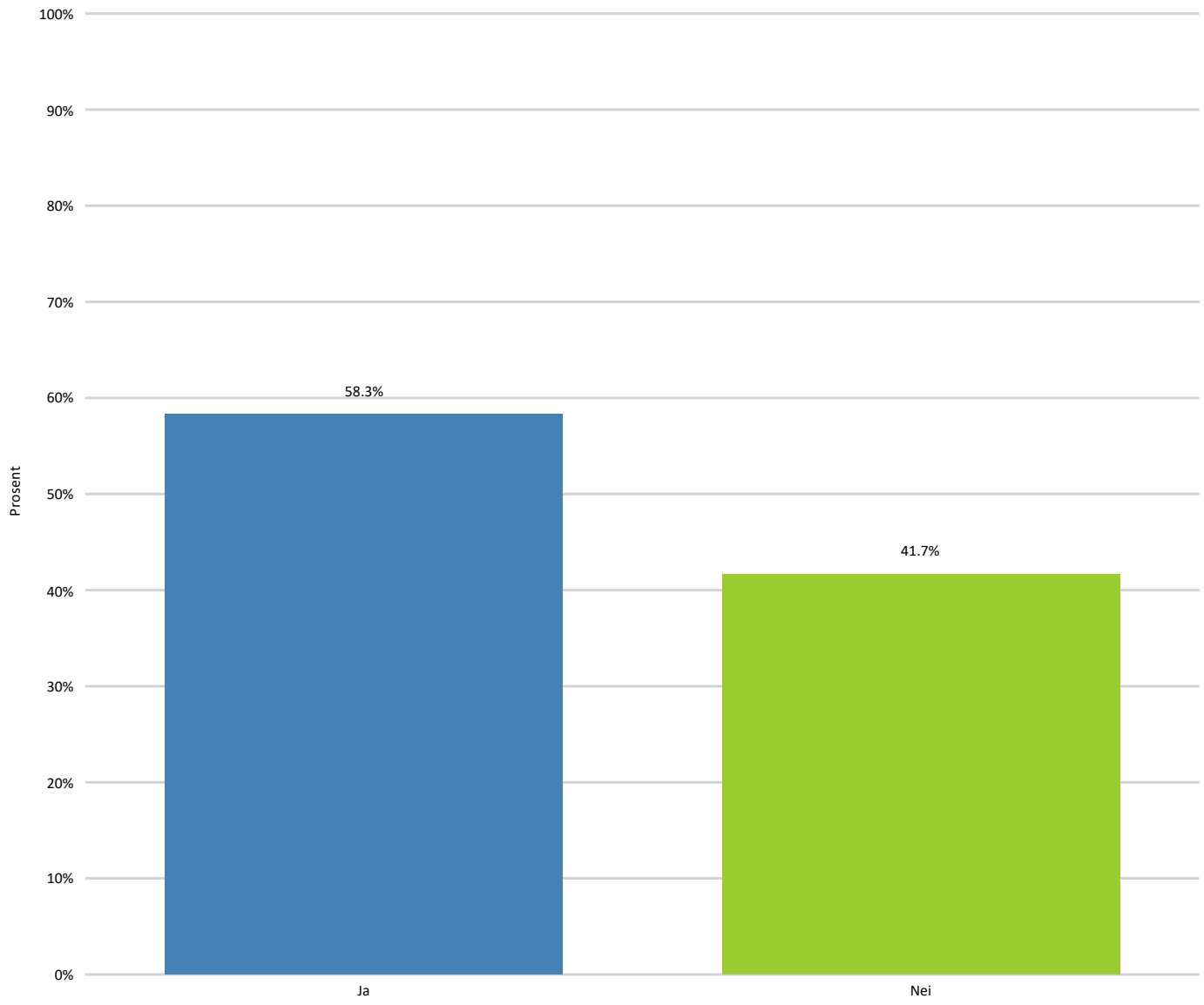



| Svar |
| --- |
| Varierer på analyse og vevstype |
| 20 % |
| Ingen fastsatt grense, men i praksis er det 5 % |
| Så lenge patolog kan se tumorceller. |
| Vi har ingen minimumskrav |

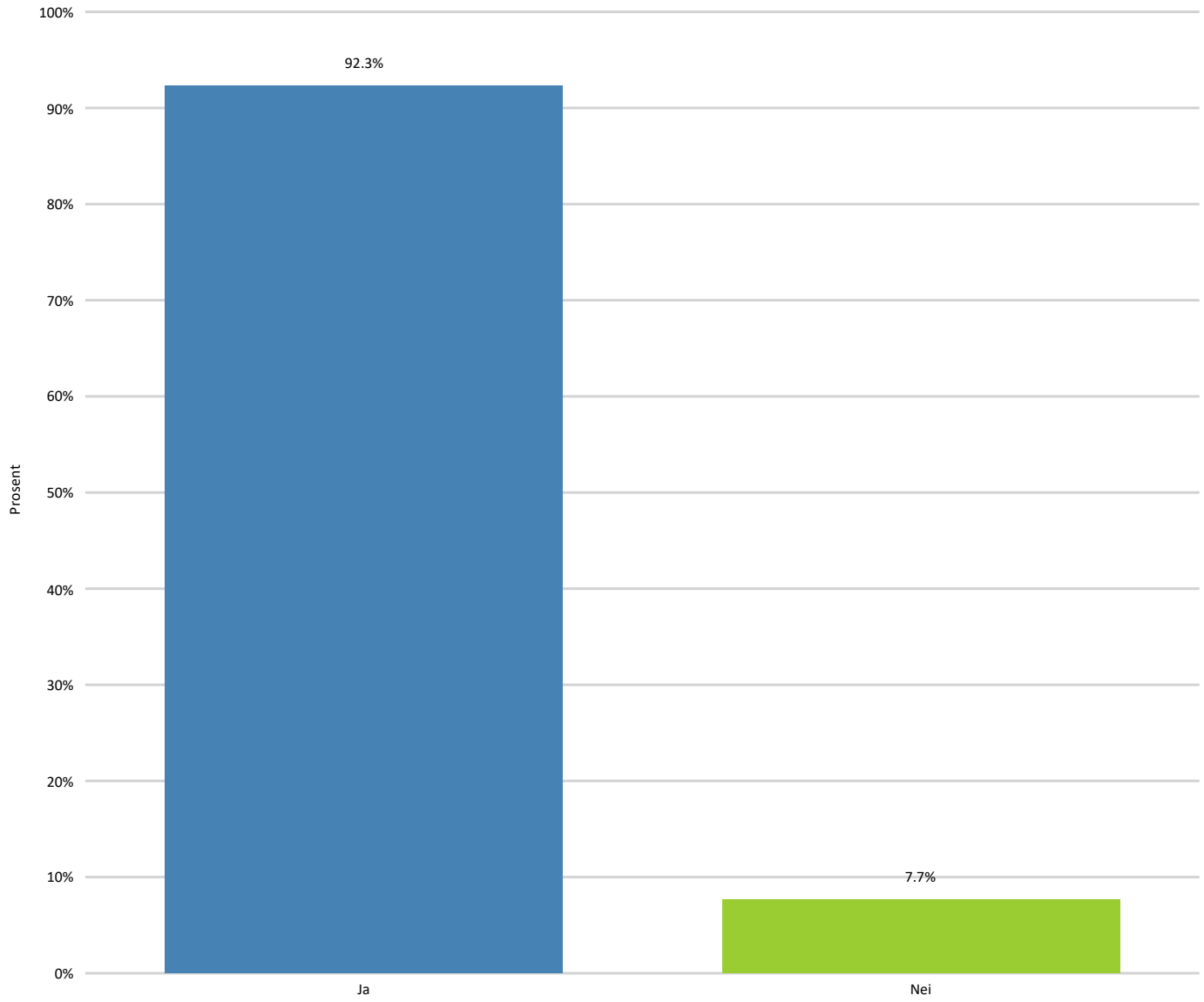
## 19. Beregner dere areal x tumorceller for å se om det er nok materialet?



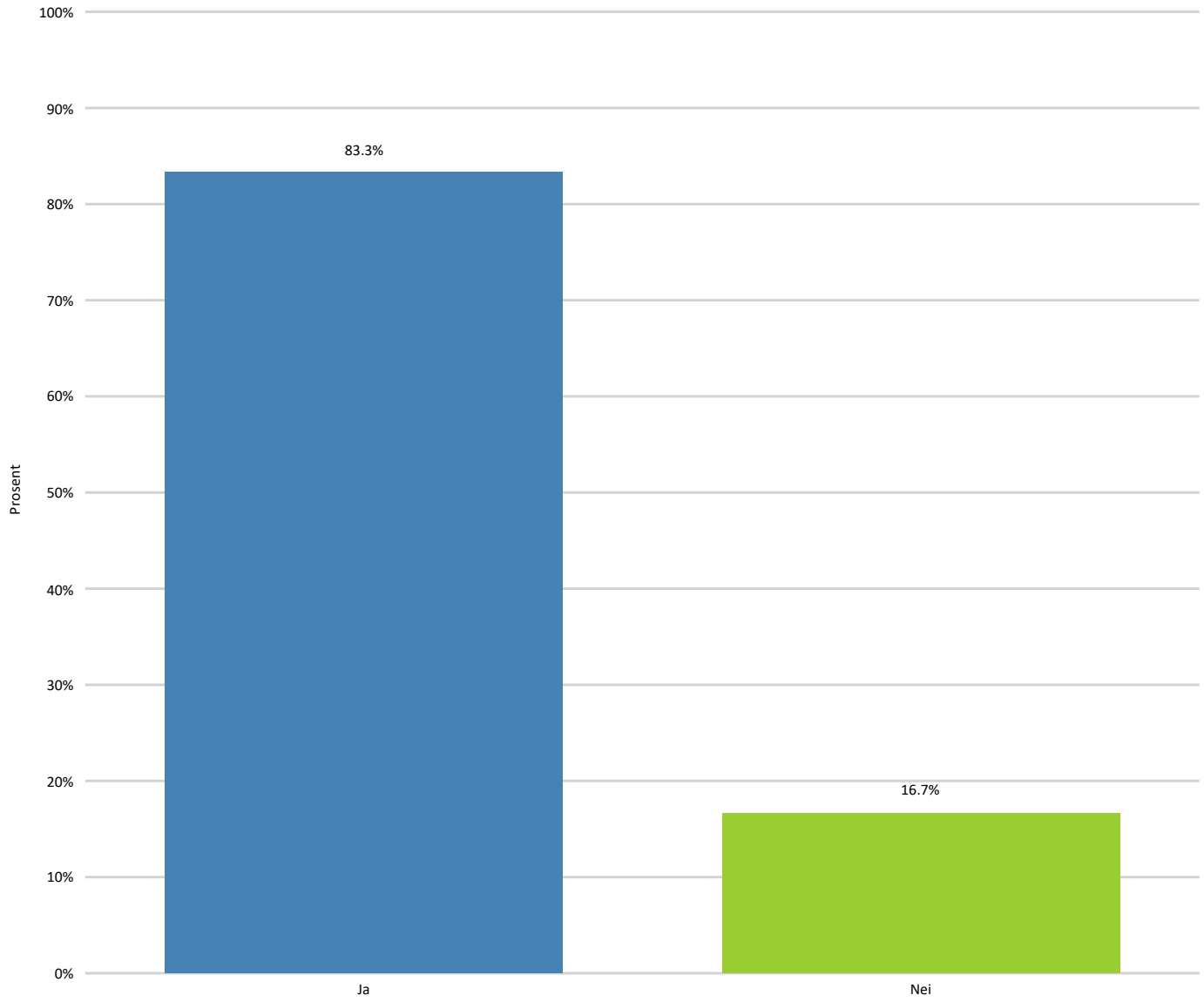
## 20. Fjernes parafin ved små biopsier for å ikke influere ekstraksjon ved bruk av xylen?



## 21. Isolerer dere  DNA/RNA materialet, selv om tumor materialet inneholder necrosis?



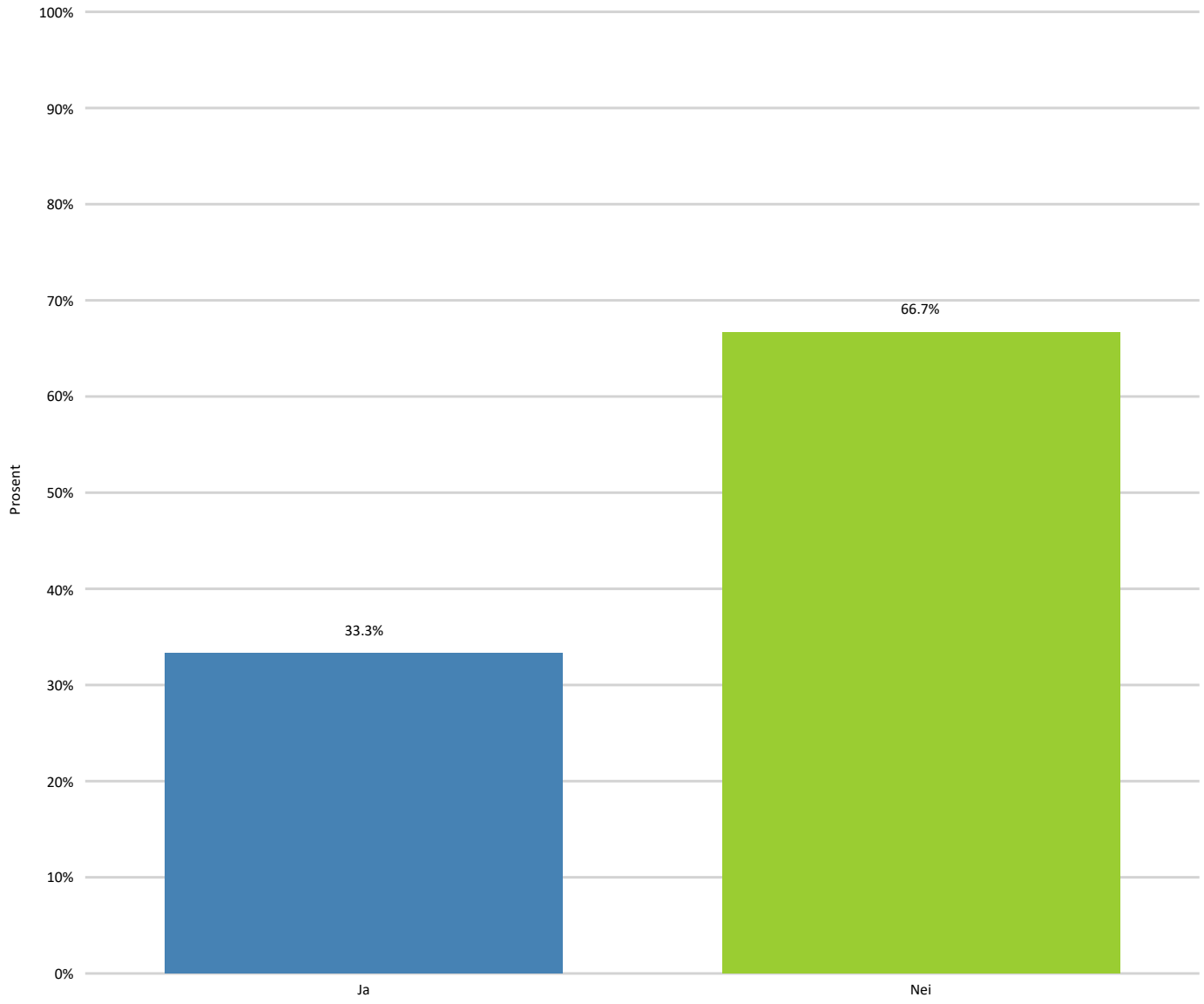
## 22. Utfører  dere makrodisseksjon?



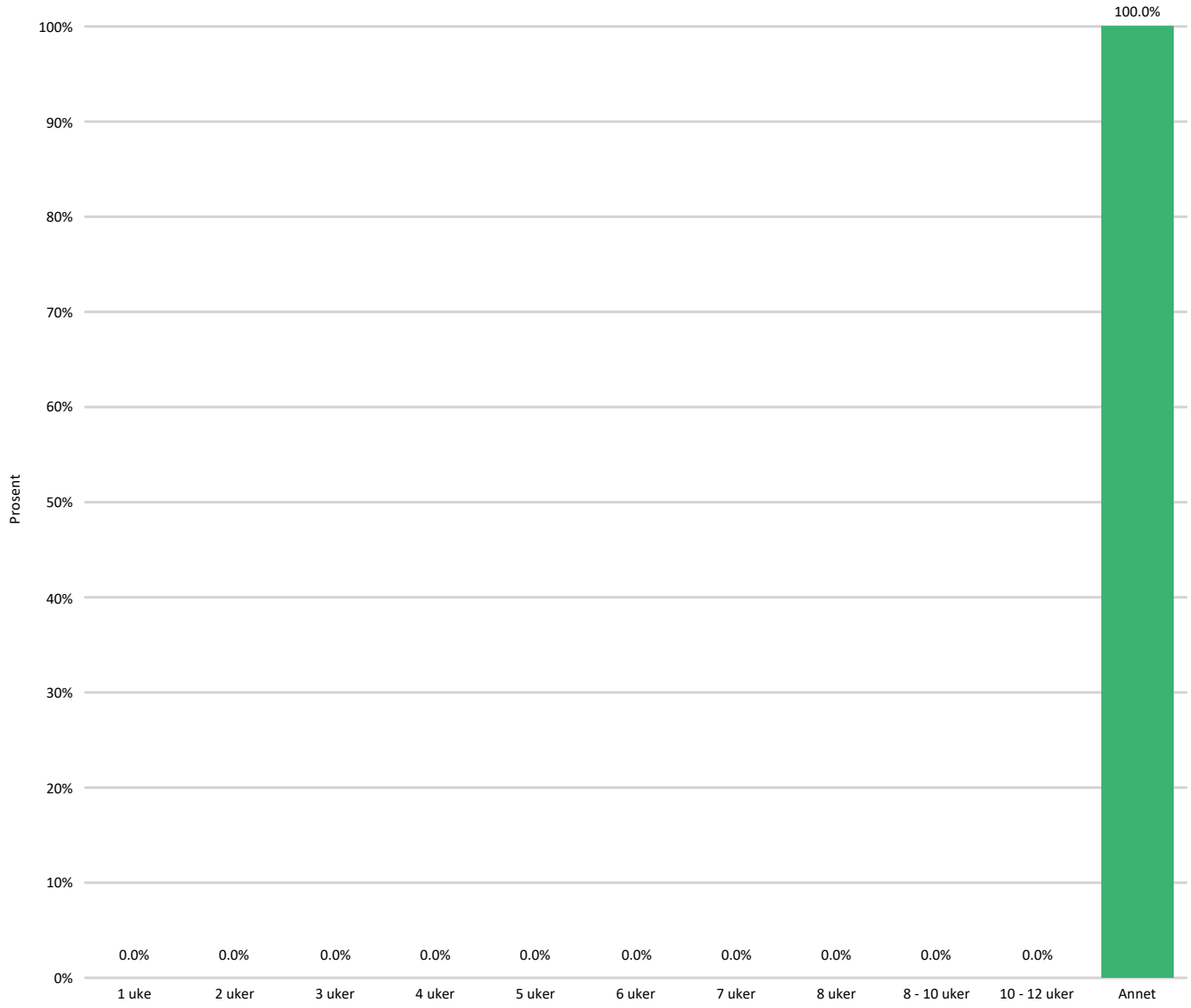
## 23. Om dere utfører makrodisseksjon, utføres det ved tumorandel lavere enn ...?

| Svar |
| --- |
| Nei |
| Utføres stort sett alltid uavhengig av tumorandel. |
| Beregner areal og tumorprosent, og følger en tabell. Ved tumorprosent under 30 tar vi flere snitt. På cytologiske utstryk har vi et anslag på antall tumorceller. Makrodisseksjon utføres alltid dersom det teknisk er mulig, for eksempel tumorcellene ligger samlet i et område og og det er mulig å orientere blokken |
| Forstår ikke spørsmålet |
| Ingen fastsatt grense. Patolog markerer område av interesse og angir tumorprosent i det angitte område. |
| Makrodisseksjon utføres for å oppnå en viss mengde tumorceller, ønskelig med over 20% tumorvev. |
| 20% |
| Makrodisseksjon utføres sjelden ved tumorcelle% lavere enn 5-10%. |
| Lavere enn 20% som anbefalt fra leverandør for OCAv3. |
| Avhenger av utbredelse, nekrose mm. Ca under 20 prosent kan være aktuelt. |

## 24. Ved utvalg av materiale for analysen bruker dere leverandørs betingelser for tumorprosent?

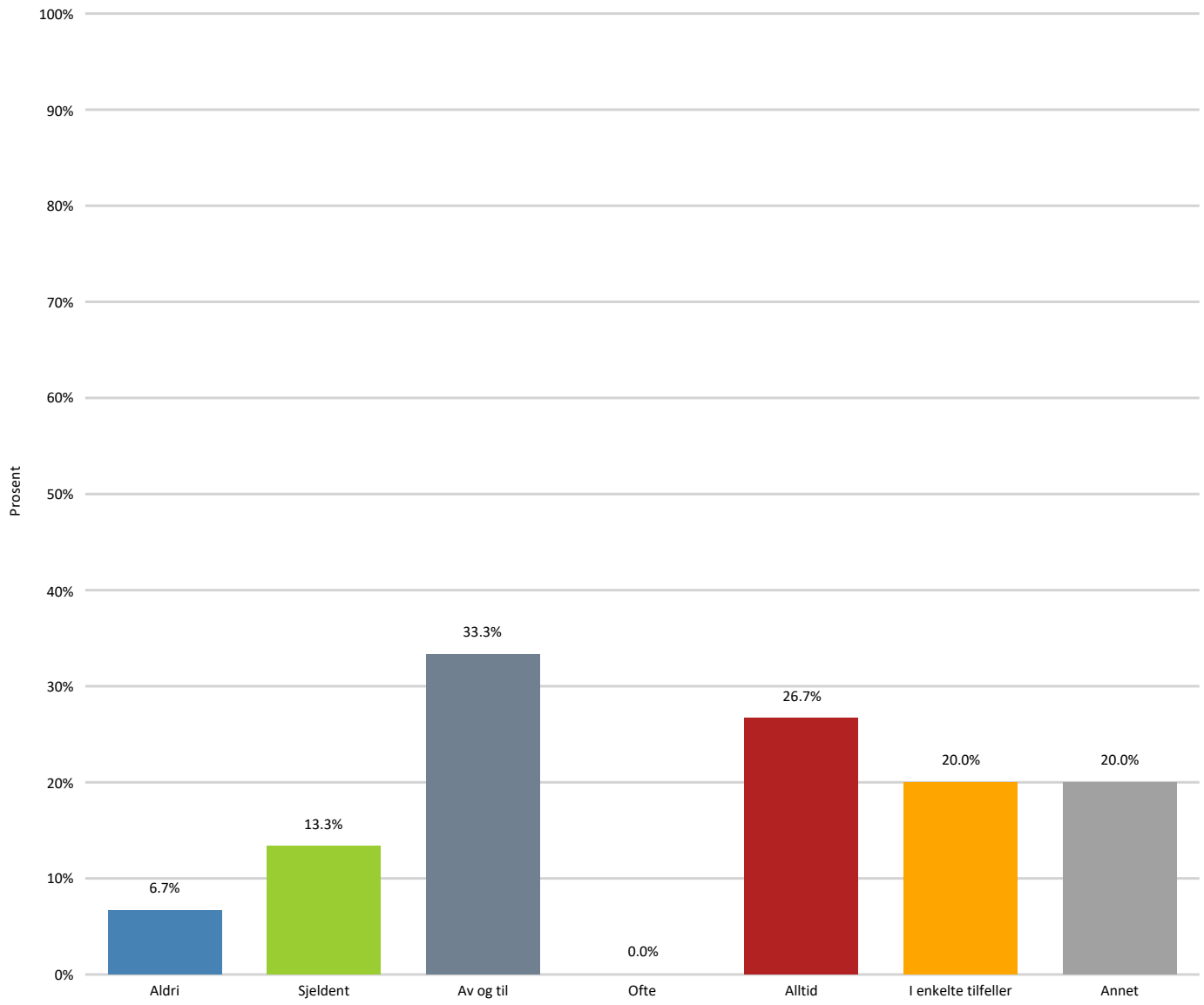


## 25. Hvilke type standarder(begrensninger) har dere på hvor gammelt FFPE materialet kan være ved utvalg av materialet?




| Svar |
|---|
| bruker materiale opp til flere år gammel |
| Har ingen øvre grense. Gjør uansett et forsøk |
| Ved enkelte tilfeller har patologen ønsket analyse av primærtomur som da kan være flere år gammel |
| Ingen begrensning |
| Ingen begrensning |
| ingen |
| Ingen fastsatt grense, men jo nyere jo bedre |
| ingen |
| NGS har begrensninger på noen paneler på FFPE materiale ved rundt 5 år, men vi gjør forsøk på eldre FFPE blokker dersom det ikke finnes annet representativt tumormateriale. |
| Ingen begrensninger |
| Ingen absolutt grense men tilstreber nyest mulig materiale |
| Flere år gammelt |
| dette avhenger av tumortype, prostata yngre enn 10 år. Vi prøver NGS uansett alder. |
| Analyserer historisk vev om det er eneste tilgjengelig. |

## 26. Benytter dere kontrollsnitt (HE-snitt) før og etter snitt til nukleinsyre?




| Svar |
| --- |
| Kun etter |
| Ved lite materiale eller usikkerhet rundt vevsmengde i blokk (grunnet andre undersøkelser etc.) bestilles HE-snitt etter uttak til nukleinsyrerens. |
| Alltid etter hvis materialet ikke er tatt direkte fra blokk |

## 27. Hvilke kit bruker dere til DNA isolering?

| Svar |
| --- |
| QIAamp DNA FFPE tissue kit |
| QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit |
| AllPrep Qiagen FFPE DNA/RNA |
| RecoverAll |
| Ingenting enda, bruker direkte snitt i Idylla kassettene, men planen er å bruke Deparaffinization Solution (Qiagen) og Genexus Purification System (ThermoFisher Scientific) |
| DNA Purification Kit ( 1.017 (ES-K110FP-C FFPE) på MagLead (Bioservices.) |
| Thermo Fisher GENEXUS FFPE PURIFI COMBO EACH (A45539) |
| Ion Torrent™ Genexus™ FFPE DNA/RNA Purification Kit (ThermoFisher scientific, Cat. No. A45539) |
| QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit fra Qiagen |
| Maxwell Purification Plus FFPE DNA kit (Promega), E.Z.N.A Tissue DNA kit (Omega), Genexus FFPE DNA and RNA Purification Kit (Thermo Fisher) |
| Kit fra Qiagen: QiaCube AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit.<br>Kit fra Promega: Maxwell RSC DNA FFPE Kit, Maxwell RSC Tissue DNA Kit |
| EZ1 FFPE DNA kit, Qiagen |
| Allprep DNA/RNA FFPE kit fra Qiagen |
| Qiagen Allprep DNA og RNA FFPE isolation kit ( vi skal gå over til Genexus purification FFPE kit om få måneder) |
| Genexus |

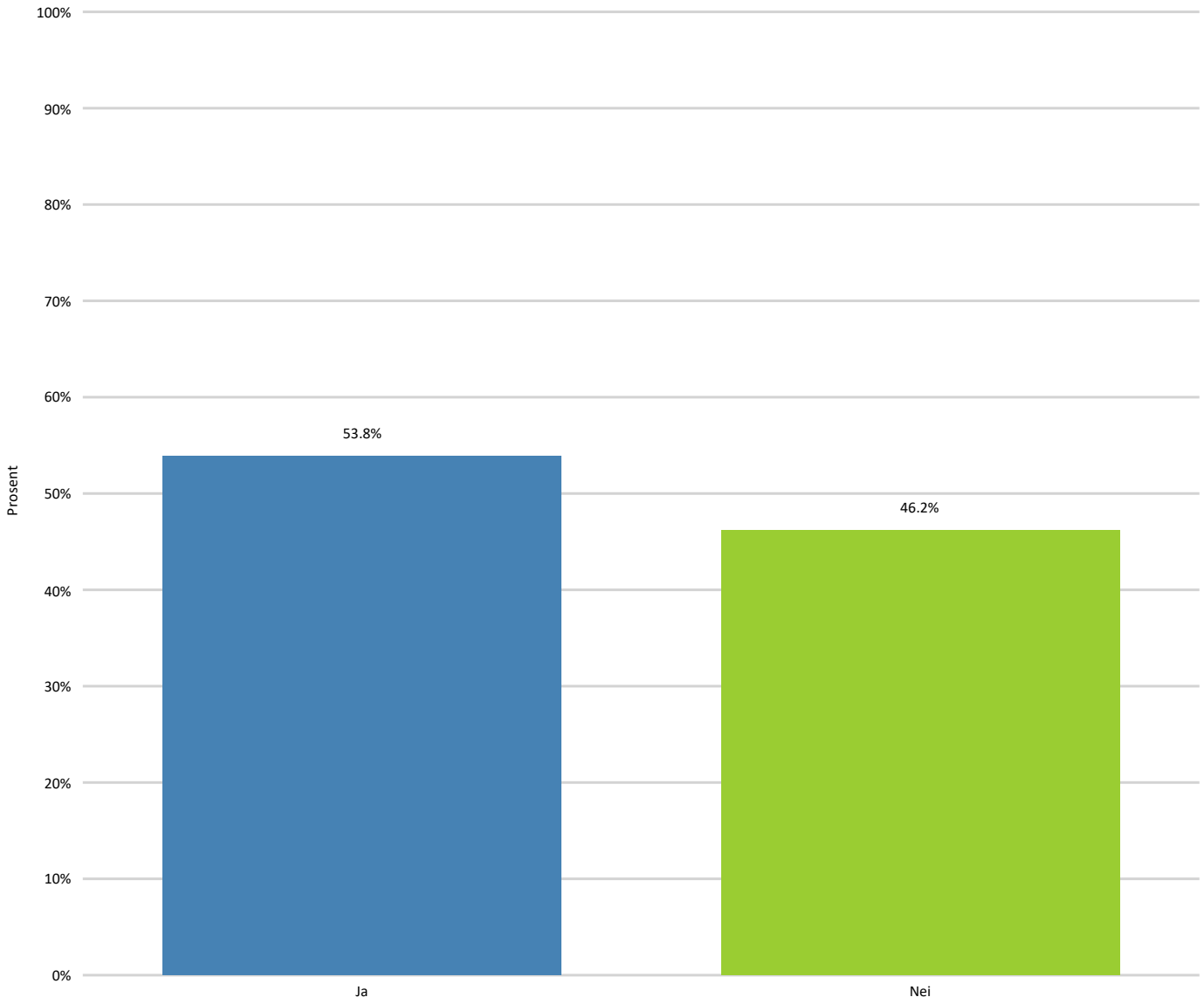
## 28. Hvilke kit bruker dere til RNA isolering?

| Svar |
| --- |
| RNeasy FFPE Kit |
| RNeasy FFPE Kit |
| AllPrep Qiagen FFPE DNA/RNA |
| RecoverAll |
| Quick-RNA FFPE MiniPrep, Zymo Research (produktnr.: BioSite - R1008, Nordic Biosite) |
| Thermo Fisher  GENEXUS FFPE PURIFI COMBO EACH (A45539) |
| Ion Torrent™ Genexus™ FFPE DNA/RNA Purification Kit (ThermoFisher scientific, Cat. No. A45539) |
| RNeasy FFPE Kit fra Qiagen |
| Genexus FFPE DNA and RNA Purification Kit (Thermo Fisher),<br>Qiagen Rneasy FFPE Kit, E.Z.N.A FFPE RNA Kit (Omega), Veracyte FFPE RNA Extraction Kit |
| Kit fra Qiagen: QiaCube AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit.<br>Kit fra Promega: Maxwell RSC RNA FFPE Kit, Maxwell RSC simplyRNA Tissue |
| Nytt kit under validering. Tidligere benyttet High Pure RNA FFPE fra Roche |
| Allprep DNA/RNA FFPE kit fra Qiagen |
| Qiagen Allprep DNA og RNA FFPE isolation kit ( vi skal gå over til Genexus purification FFPE kit om få måneder) |
| Genexus |

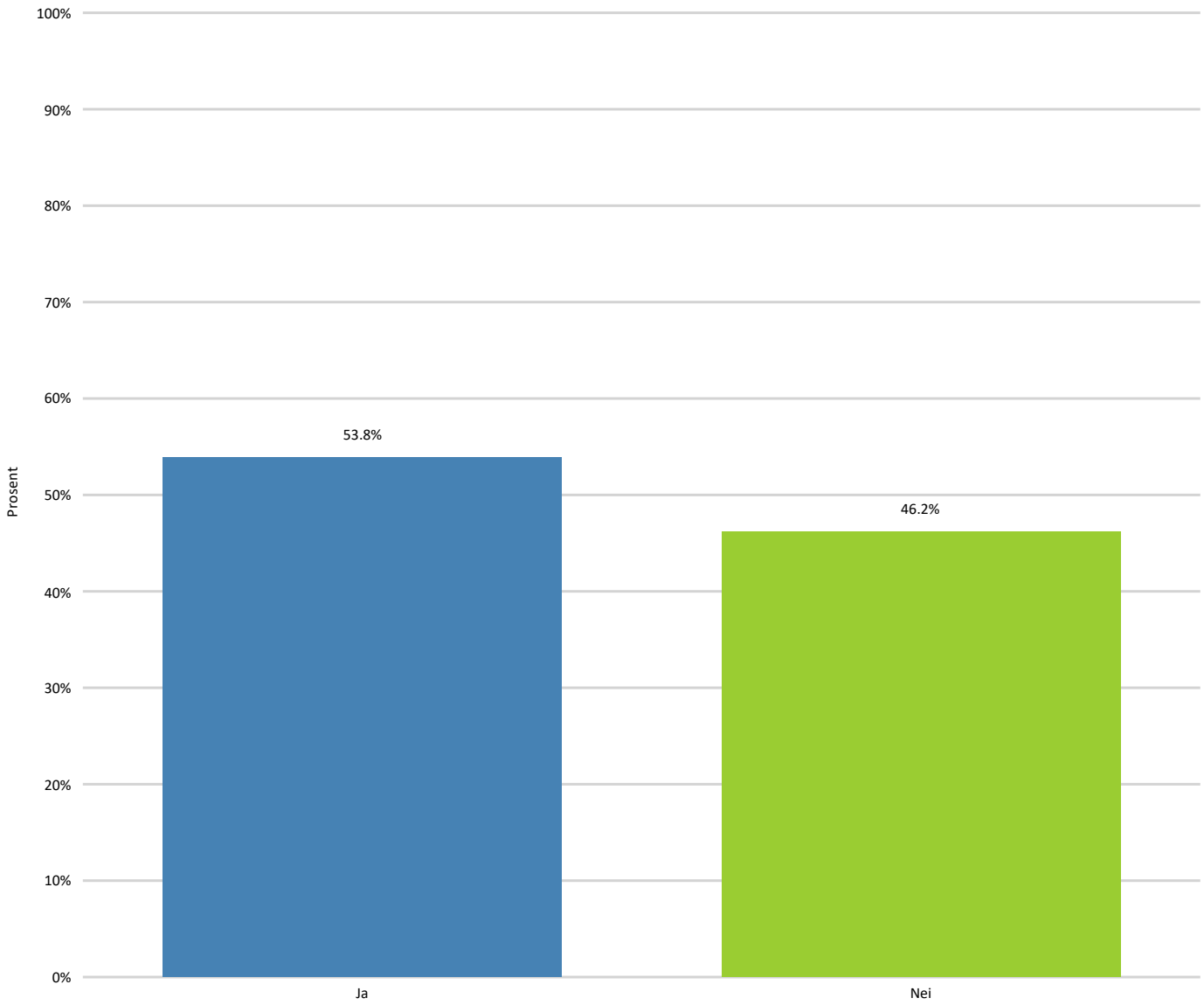
## 29. Angi hvilken metode som benyttes når det er for lite tumorvev

| Svar |
| --- |
| Samme kittene, eller avvise analysen |
| Vi har en egen oppkonsentreringsprosedyre for DNA.<br>Hvis vi har for lite materiale for ønsket metode så har andre metoder man heller kan velge |
| Vi kan analysere med Idylla som bekreftelse |
| En av de ovennevte; avhenger om også RNA skal ekstraheres. |
| Bruker samme metode som tidligere beskrevet |
| Thermo Fisher  GENEXUS FFPE PURIFI COMBO EACH (A45539) |
| Vi har ingen egen metode som benyttes ved lite tumorvev. |
| eluere i lavere elueringsvolum,<br>mikrodiseksjon og bruk  rå ekstrakt. |
| Dersom mislykket NGS eller ved dekalsinering/ikke egnet materiale for NGS, utføres alternative metoder. Idylla, qPCR kit (Thyroid Cancer Mutation Detection Kit (DNA)) eller Sanger sekvensering. |
| Bruker QiaCube til små, ferske mammabiopsier. Ellers bruker vi Maxwell uavhengig av mengde tumorvev. |
| Hvis mulig makrodisseksjon, hvis ikke avvises prøven. |
| Ingen alternativ metode på enheten. Pasient får tilbud om FM liquid. |
| Metode for enkelte av behandlingsrelevante gener Cobas EGFR (min 10% TA), Idylla KRAS, NRAS, BRAF (10% TA). Idylla GeneFusion for NSCLC fusjoner (unntatt NRG1) ved fail på RNA NGS. |
| Genexus |

## 30. Vurderes grad av nekrose i forhold til resultat og fragmentering?

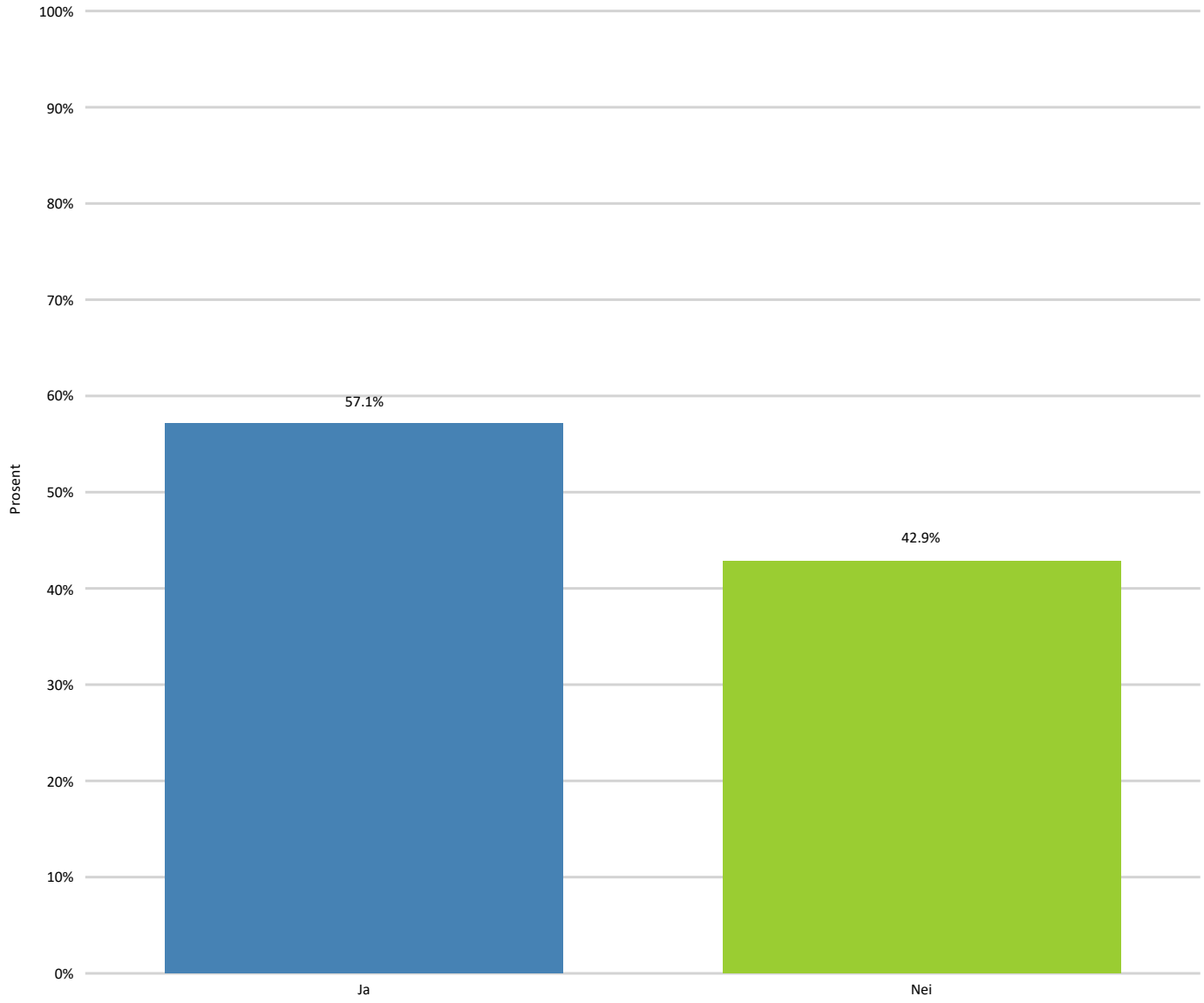


## 31. Angis vevskvalitet og mengde betennelses celler i vevet? (som kan maskere og gi en falsk høy DNA konsentrasjon/feil fortynning og input av tumormengde i NGS)

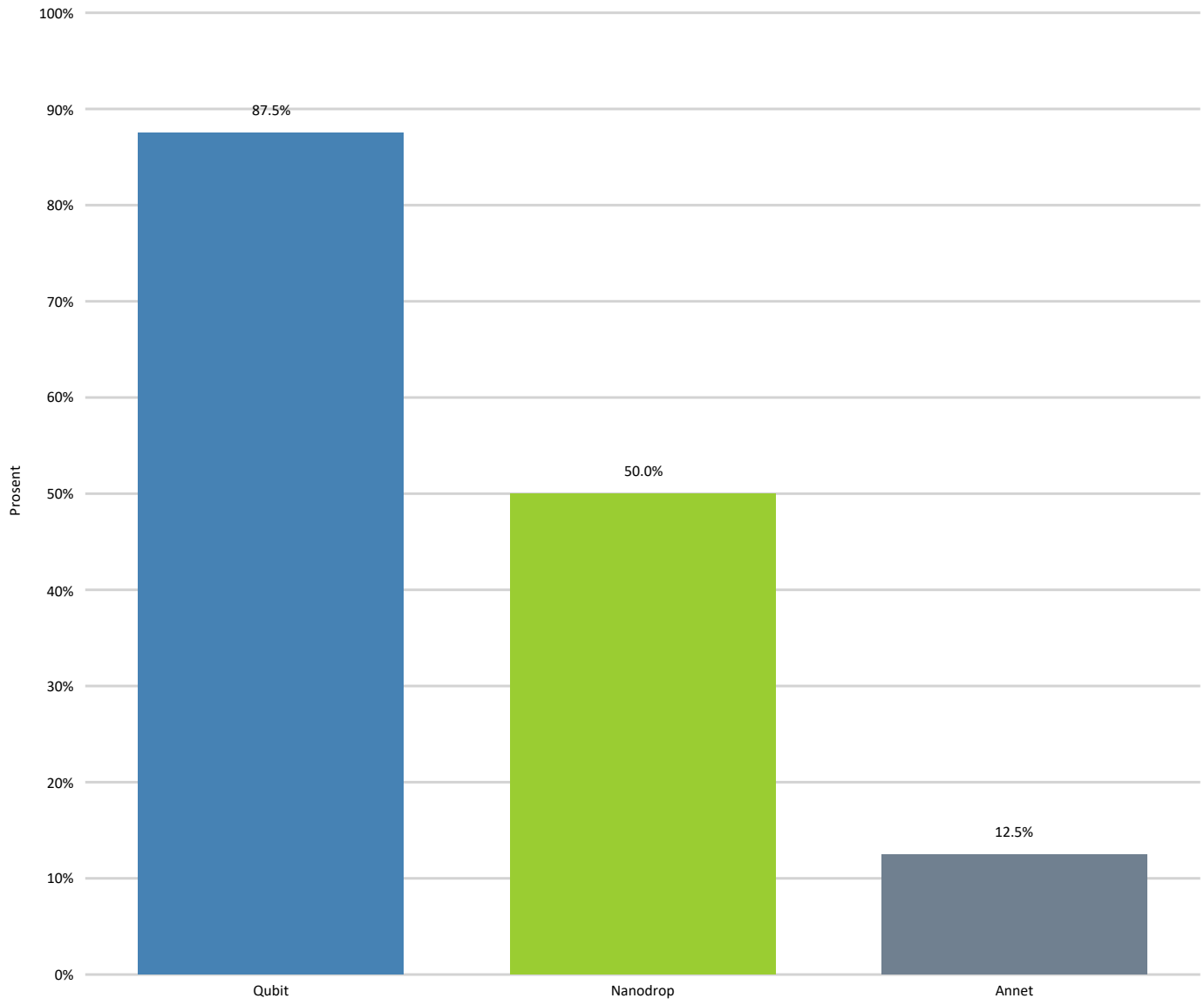


Del 3: Isolering DNA/RNA

## 32. Bruker dere (spektrofotometer) til DNA/RNA konsentrasjonsmåling?



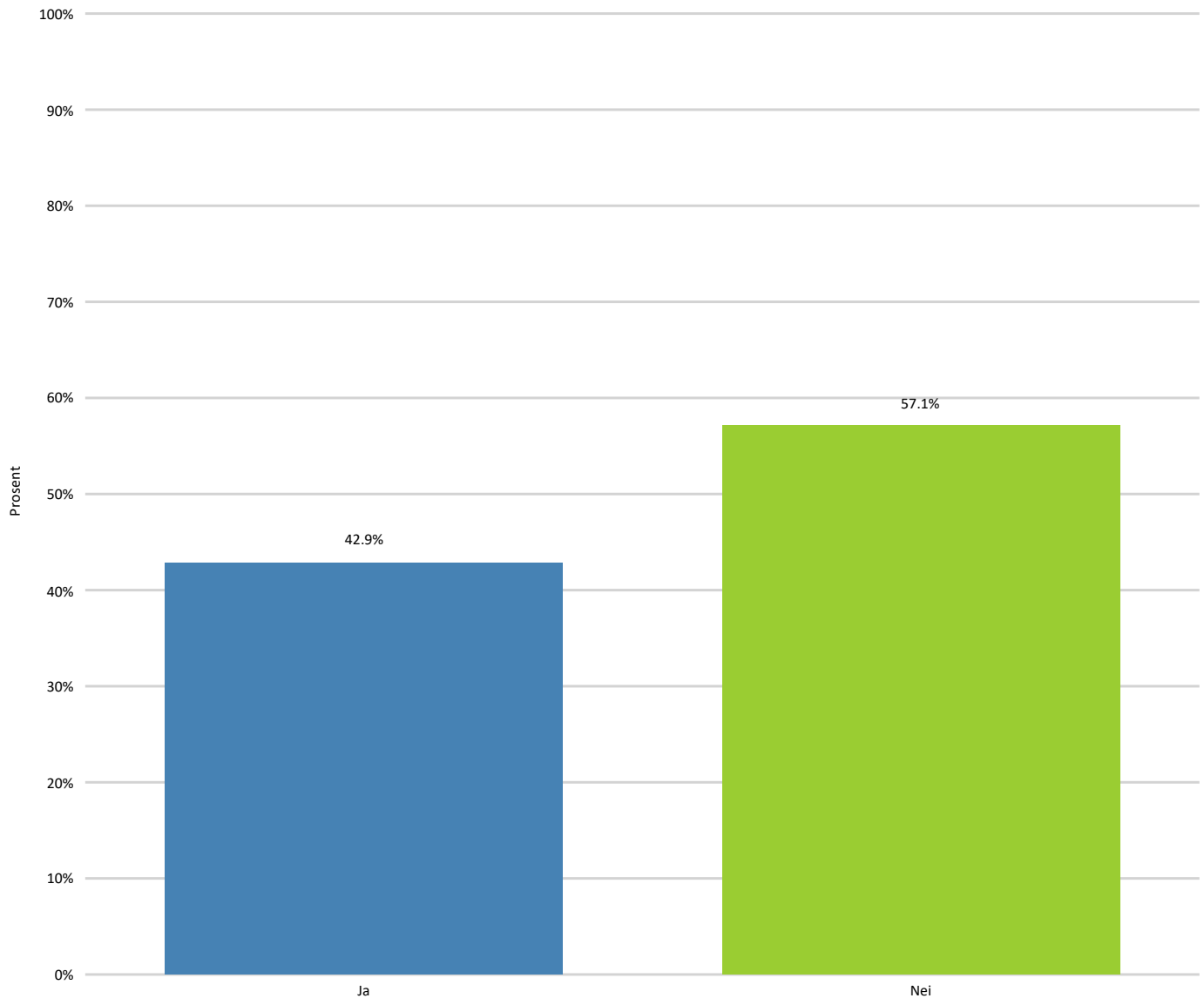
## 33. Om dere bruker (spektrofotometer) til DNA/RNA konsentrasjonsmåling, hvilket type instrument bruker dere?



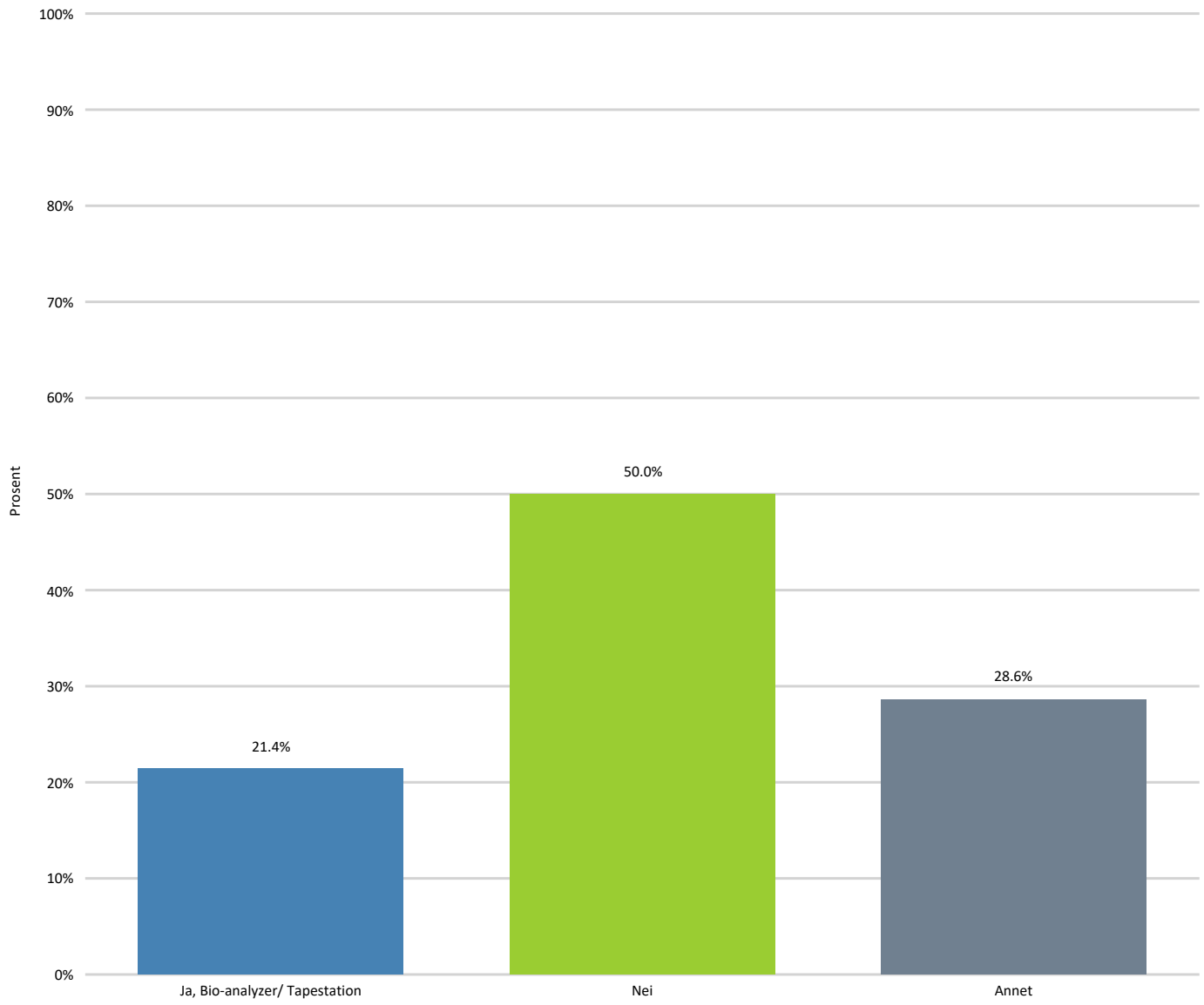

**Svar**

Måling av Genexus Purification System, men skal være en innebygget Qubit

## 34. Sjekker dere fragmentering av DNA/RNA?

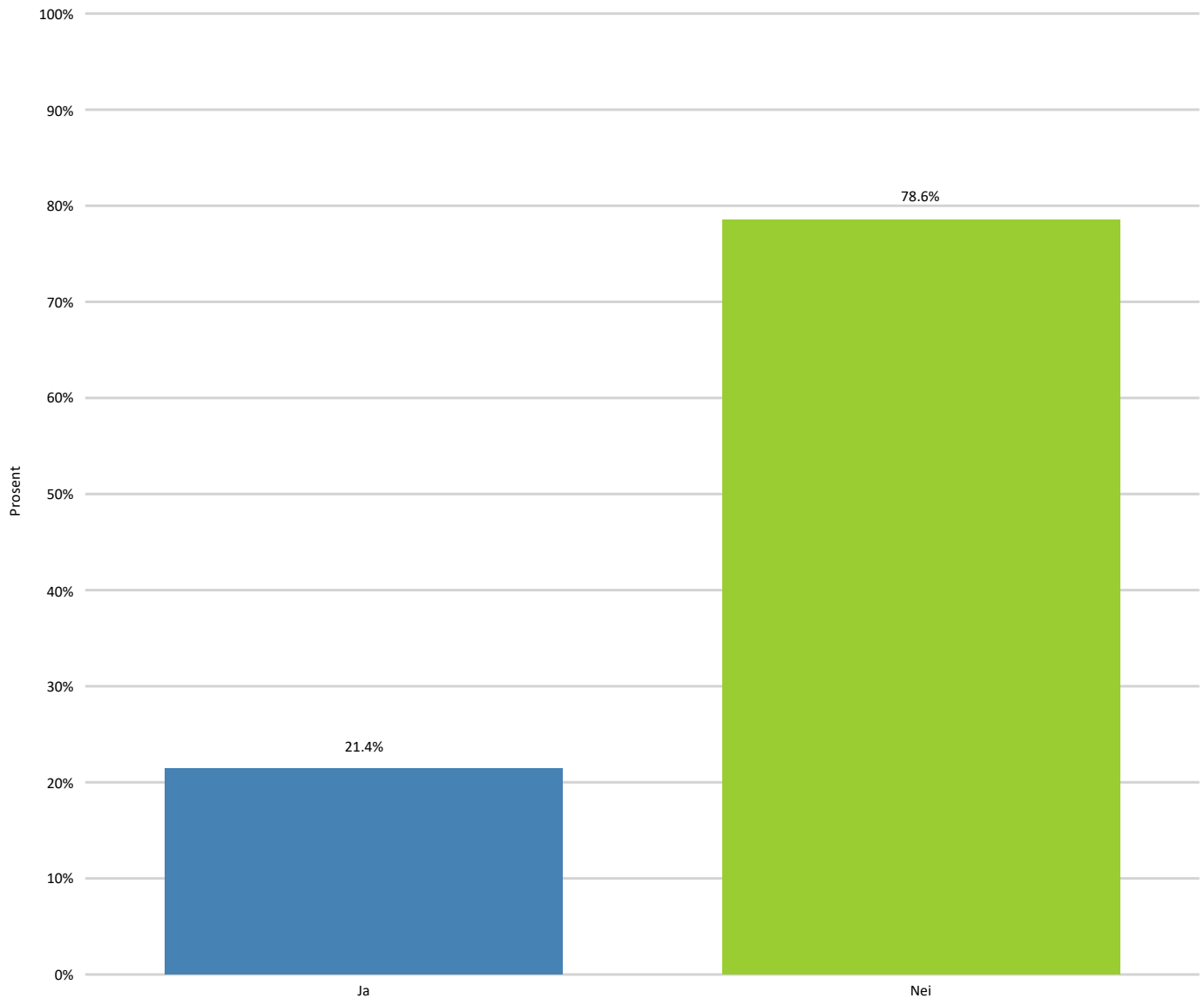


## 35. Bruker dere Bio-analyzer/ Tapestation eller annet utstyr, til å sjekke fragmenteringsgrad av DNA/RNA?

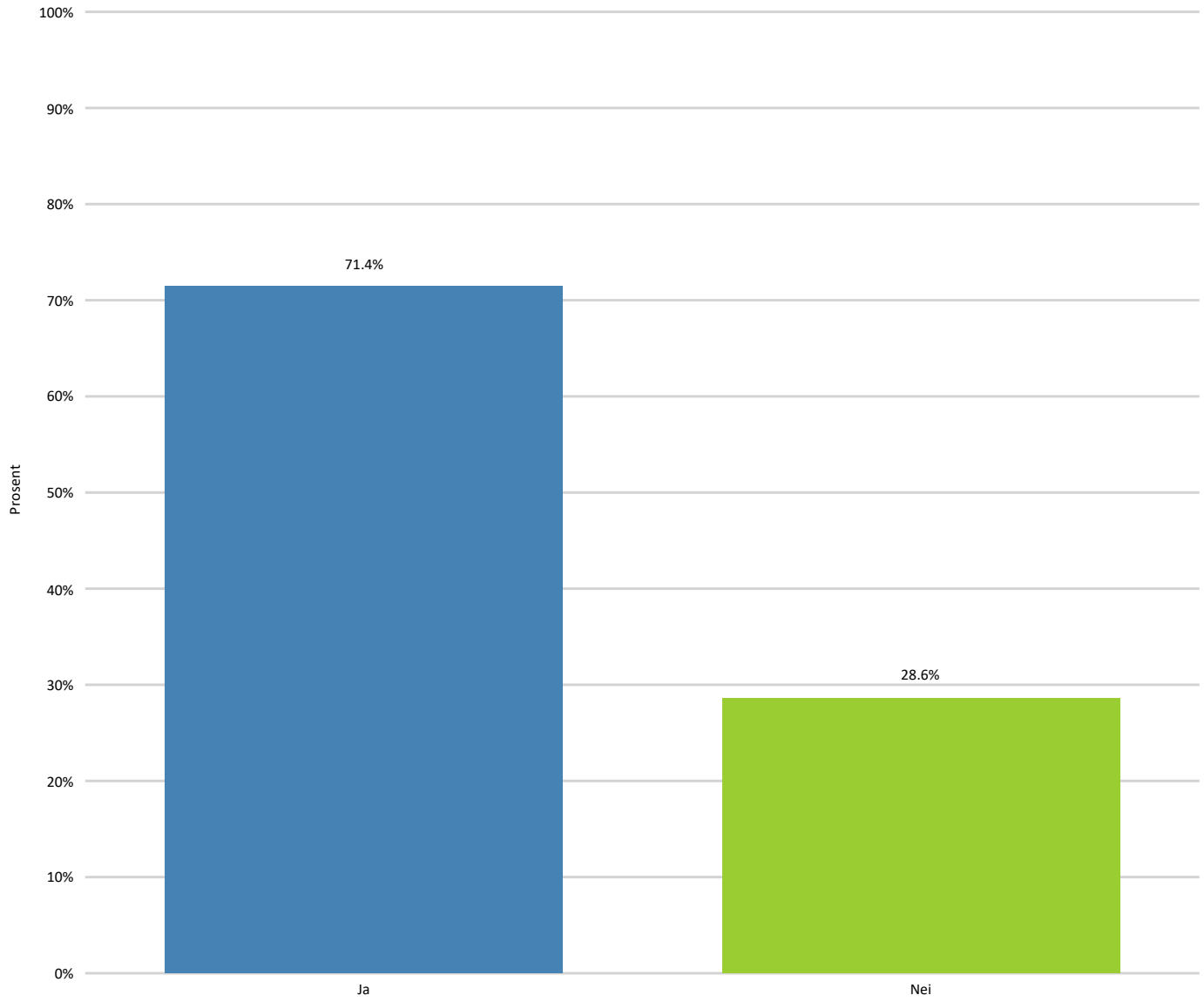



| Svar |
| --- |
| RT-PCR for DNA |
| Genexus |
| Tapestation brukes i ettertid for å undersøke dårlige prøver/bibliotek |
| realtime PCR |

## 36. Bruker dere kommersielle kit for å sjekke DNA/RNA  fragmentering?



## 37. Følger dere det som står i protokollen når det gjelder input  av DNA/RNA mengde?



## 38. Minste nødvendige DNA konsentrasjon for: (spesifiser under) Hvor strengt følges denne grensen?

**Svar**

Input i sekvenseringen: Input i library prep.: 7ng/µl

Input i sekvenseringen: Input i library prep.:

Input i sekvenseringen: Input i library prep.: 35 pM

Vi startet å analysere med 40 pM som anbefalt av leverandør, men måtte pga høy polyklonalitet justere oss ned til 35 pM.

Input i sekvenseringen: Input i library prep.: 10 ng

Hver prøve har et DNA/RNA input på 10 ng. Ferdige DNA/RNA bibliotek pooles i robot for en samlet konsentrasjon på ca. 100 pM.
DNA library og RNA library blandes i 4:1 forhold i en samlet konsentrasjon på 32 pM i et volum på 25 mikroliter.

Input i sekvenseringen: Input i library prep.:

Input i sekvenseringen: 0,7 ng/µl Input i library prep.: 50pM

Input i sekvenseringen: Input i library prep.:

Input i sekvenseringen: - Input i library prep.: 1,11 ng/µl, men alt >0 settes på instrumentet

Input i sekvenseringen: 10 ng Input i library prep.: 10 ng

Grensen følges ikke. Laboratoriet sekvenserer alle prøver uavhengig av konsentrasjon

Input i sekvenseringen: Input i library prep.:

Input i sekvenseringen: Input i library prep.: Ampliseq paneler: 5 nM - fortynnes til 1,2 pM til instr.
Ampliseq Fokus panel: 50 ng
Ampliseq Childhood: 150 ng
Ampliseq BRCA: 150 ng
Ampliseq Myeloid: 10 ng
TSO500: 50 ng fragmentert DNA
Dette er standard konsentrasjon, forsøker også lavere konsentrasjoner om nødvendig

Input i sekvenseringen: Input i library prep.:
Er ikke vi som gjør dette

Input i sekvenseringen: Bibliotek normaliseres til
TruSightTumor15: 5 ng/ul (Qubit)
AmpliSeq for Illumina BRCA panel: 2nM
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer panel: 2nM
For alle bibliotek sekvenseres en pool på 10pM
Vi sekvenserer alle bibliotek uavhengig av konsentrasjon, men vurderer resultat opp mot kvalitet på bibliotek og sekvensering.

Input i library prep.:
TruSightTumor15: 2 ng/ul (Qubit), 5 ul
AmpliSeq for Illumina BRCA panel: 4 ng/ul (Qubit), 5 ul
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer panel: 10 ng/ul (Qubit), 5 ul
Vi tilstreber å etterfølge kravene vi har validert for input i bibliotekspreparering, men vurderer i enkelte tilfeller at prøven kan settes opp med lavere konsentrasjon. Dette vil da alltid opplyses om i svaret.

Input i sekvenseringen: Ingen absolutt grense men gjerne ikke lavere enn 2 ng/ul.
Input i library prep.: Ingen fast nedre grense, men gjerne ikke lavere enn 1 ng/ul.

Input i sekvenseringen: 40pM Input i library prep.: 10ng input (0,67ng/µl i 15µl DNA og

Input i sekvenseringen: 10 ng Input i library prep.:

## 39. Minste nødvendige RNA konsentrasjon for: (spesifiser under) Hvor strengt følges denne grensen?

**Svar**

| |
|---|
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: 7ng/µl |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: 35 pM<br><br>Vi startet å analysere med 40 pM som anbefalt av leverandør, men måtte pga høy polyklonalitet justere oss ned til 35 pM. |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: 10 ng |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: |
| Input i sekvenseringen: 0,9ng/µl Input i library prep.: 50pM |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: |
| Input i sekvenseringen: - Input i library prep.: 0,95 ng/µl, men alt >0 settes på instrumentet |
| Input i sekvenseringen: 10 ng Input i library prep.: 10 ng<br><br>Grensen følges ikke. Laboratoriet sekvenserer alle prøver uavhengig av konsentrasjon |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: Så lenge det finnes tilstrekkelig nok RNA molekyler med nødvendig fragment lengde. |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.: Ampliseq paneler: 5 nM --> fortynnes til 1,2 pM til instr.<br>Ampliseq Fokus panel: 50 ng RNA (til cDNA syntese)<br>Ampliseq Childhood: 140 ng<br>Ampliseq Myeloid: 10 ng<br>TSO500: 120 ng RNA (til cDNA syntese)<br>Dette er standard konsentrasjon, forsøker også lavere konsentrasjoner om nødvendig |
| Input i sekvenseringen: Input i library prep.:<br>Er ikke vi som gjør dette |
| Input i sekvenseringen: Bibliotek normaliseres til<br>AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer panel: 2nM<br>For alle bibliotek sekvenseres en pool på 10pM<br>Vi sekvenserer alle bibliotek uavhengig av konsentrasjon, men vurderer resultat opp mot kvalitet på bibliotek og sekvensering.<br><br>Input i library prep.:<br>AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer panel: 10 ng/ul (Qubit), 5 ul<br>Vi tilstreber å etterfølge kravene vi har validert for input i bibliotekspep, men vurderer i enkelte tilfeller at prøven kan settes opp med lavere konsentrasjon. Dette vil da alltid opplyses om i svaret. |
| Input i sekvenseringen: Ingen absolutt grense men gjerne ikke lavere enn 2 ng/ul.<br>Input i library prep.: Ingen fast nedre grense, men gjerne ikke lavere enn 2 ng/ul |
| Input i sekvenseringen: 40pM Input i library prep.: 10ng input (1,25 i 8µl ng/µl RNA) |
| Input i sekvenseringen: 10 ng Input i library prep.: |

## 40. Hva er minimum krav for DNA input(NG) for NGS bibliotek prep?

| Svar |
| --- |
| Mengden DNA: 10ng Hvilket panel: Oncomine Focus panel fra Thermo Fisher |
| Mengden DNA: Hvilket panel |
| Mengden DNA: 10 ng Hvilket panel Oncomine Focus Assay - Ion Torrent<br>Mengde RNA: 10 ng |
| Mengden DNA: 10 ng Hvilket panel: Oncomine Childhood Cancer Research Assay |
| Mengden DNA: Hvilket panel |
| Mengden DNA: 10ng Hvilket panel: Oncomine Focus og Oncomine Comprehensive |
| Mengden DNA: Hvilket panel |
| Mengden DNA: som over Hvilket panel OCAv.3 |
| Mengden DNA: 10 ng Hvilket panel: Thermo Fischer: Oncomine Precision Assay (Oncomine Focus Assay som back up) og Oncomine BRCA Research Assay, |
| Mengden DNA: Hvilket panel: Så lenge det finnes tilstrekkelig nok genomisk DNA molekyler med nødvendig fragment lengde for bib-prep. |
| Mengden DNA: Hvilket panel<br>Ampliseq Fokus panel: 50 ng<br>Ampliseq Childhood: 150 ng<br>Ampliseq BRCA: 150 ng<br>Ampliseq Myeloid: 10 ng<br>TSO500: 50 ng fragmentert DNA<br>Dette er standard konsentrasjon, forsøker også lavere konsentrasjoner om nødvendig |
| Mengden DNA: Hvilket panel<br>Er ikke vi som gjør dette |
| Input i library prep.:<br>TruSightTumor15: 10 ng<br>AmpliSeq for Illumina BRCA panel: 20 ng<br>AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer panel: 50 ng<br>Vi tilstreber å etterfølge kravene vi har validert for input i biblioteksprep, men vurderer i enkelte tilfeller at prøven kan settes opp med lavere konsentrasjon. Dette vil da alltid opplyses om i svaret. |
| Mengden DNA: ingen fast nedre grense, men gjerne ikke lavere enn 10 ng Hvilket panel: TSO500HT |
| Mengden DNA: (se forrige svar) Hvilket panel: HTS Oncomine Comprehensive Assay v3 |
| Mengden DNA: Hvilket panel<br>10ng dx express |

## 41. Hvilken metode blir benyttet når DNA er fragmentert eller har for lite input?

| Svar |
| --- |
| Prøve samme metode,<br>eller Idylla fra Biocartis (KRAS, NRAS, BRAF) |
| Vi prøver å analysere uansett, hvis kvalitetsparameterne faller utenfor, må vi be om ny prøve |
| Vi måler kun DNA/RNA konsentrasjon med Qubit, ikke med qPCR. Ved lave konsentrasjoner (under 2 ng/mikroliter) overestimerer Qubit konsentrasjon i forhold til qPCR. Selv om Thermo anbefaler å ikke benytte materiale med lavere konsentrasjon enn 2 ng/mikroliter, går vi en del lavere enn dette. Vi forsøker å ikke sekvensere prøver med lavere input enn 1 ng/mikroliter, men går unntaksvis (avhengig av problemstilling) noe lavere. Konsekvensen av dette er sannsynlig overestimering av konsentrasjon slik at input blir for lav.<br>I tillegg er slikt materiale ofte av dårlig kvalitet, slik at vi har høy risiko for falsk negativ grunnet redusert sensitivitet, men også falske positive grunnet forhøyet frekvens av artefakter/reelle funn i bakgrunn av lite annet amplifiserbart materiale.<br>Disse momentene tas i betrakning ved rapportering. |
| Samme metode som tidligere beskrevet |
| Samme metode benyttes for alle prøver (Genexus) |
| Ingen alternativ metode. Ber eventuelt om ny ekstraksjon. |
| Hvis DNA er for lite, i tillegg med en høy fragmenteringsgrad er det uegnet. |
| Ved bibliotekseksprep blir stort sett alt av library prep tatt videre til sekvensering, unntak dersom ingen utslag på Tapestation og lavt utbytte ved Qubit måling etter amplifisering og rens av bibliotekseksprep. |
| Er ikke vi som sekvenserer |
| Ingen, vi forsøker å konsentrere DNA med Amicon filter hvis DNA-konsentrasjonen er for lav til validert input. |
| Ingen alternativ metode tilgjengelig. Lave inputs av DNA tas ofte med. Det gjøres vurderingen på prøvekvalitet underveis i oppsettet. |
| Konfirmerer funn med enten EGFR Cobas mutation v2 kit, Idylla KRAS, NRAS, BRAF ( evt. Therascreen BRAF V600 kit) |
| Ikkje vært aktuelt |

## 42. Hvilken metode blir benyttet når RNA er fragmentert eller har for lite input?

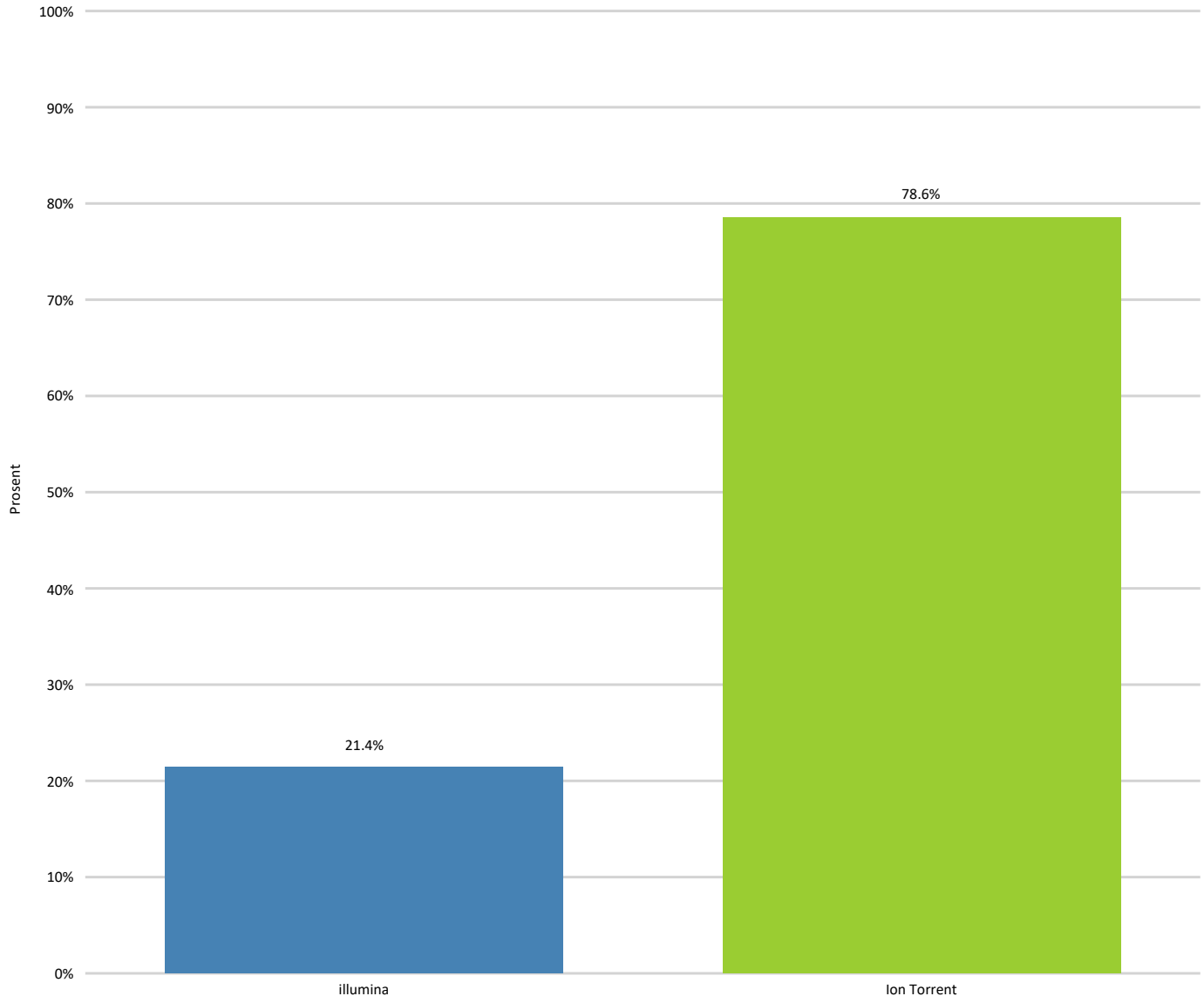
| Svar |
| --- |
| Prøve samme metode eller Idylla fusjons-kit |
| Vi prøver å analysere uansett, hvis kvalitetsparameterne faller utenfor, må vi be om ny prøve |
| Prøven blir besvart inkonklusiv dersom kvalitetsparametere ikke innfris. |
| Samme metode som tidligere beskrevet |
| Samme metode benyttes for alle prøver (Genexus) |
| Ingen alternativ metode. Ber eventuelt om ny ekstraksjon. |
| Hvis RNA er for lite, i tillegg med en høy fragmenteringsgrad er det uegnet. |
| Ved bibliotekprep blir stort sett alt av library prep tatt videre til sekvensering, unntak dersom ingen utslag på Tapestation og lavt utbytte ved Qubit måling etter amplifisering og rens av bibliotekprep. |
| Er ikke vi som sekvenserer |
| Ingen |
| Ingen alternativ metode tilgjengelig. Lave inputs av DNA tas ofte med. Det gjøres vurderingen på prøvekvalitet underveis i oppsettet. |
| Idylla GeneFusion kit |
| Ikkje vært aktuelt |

## 43. Hvilke NGS paneler benyttes på deres lab.?

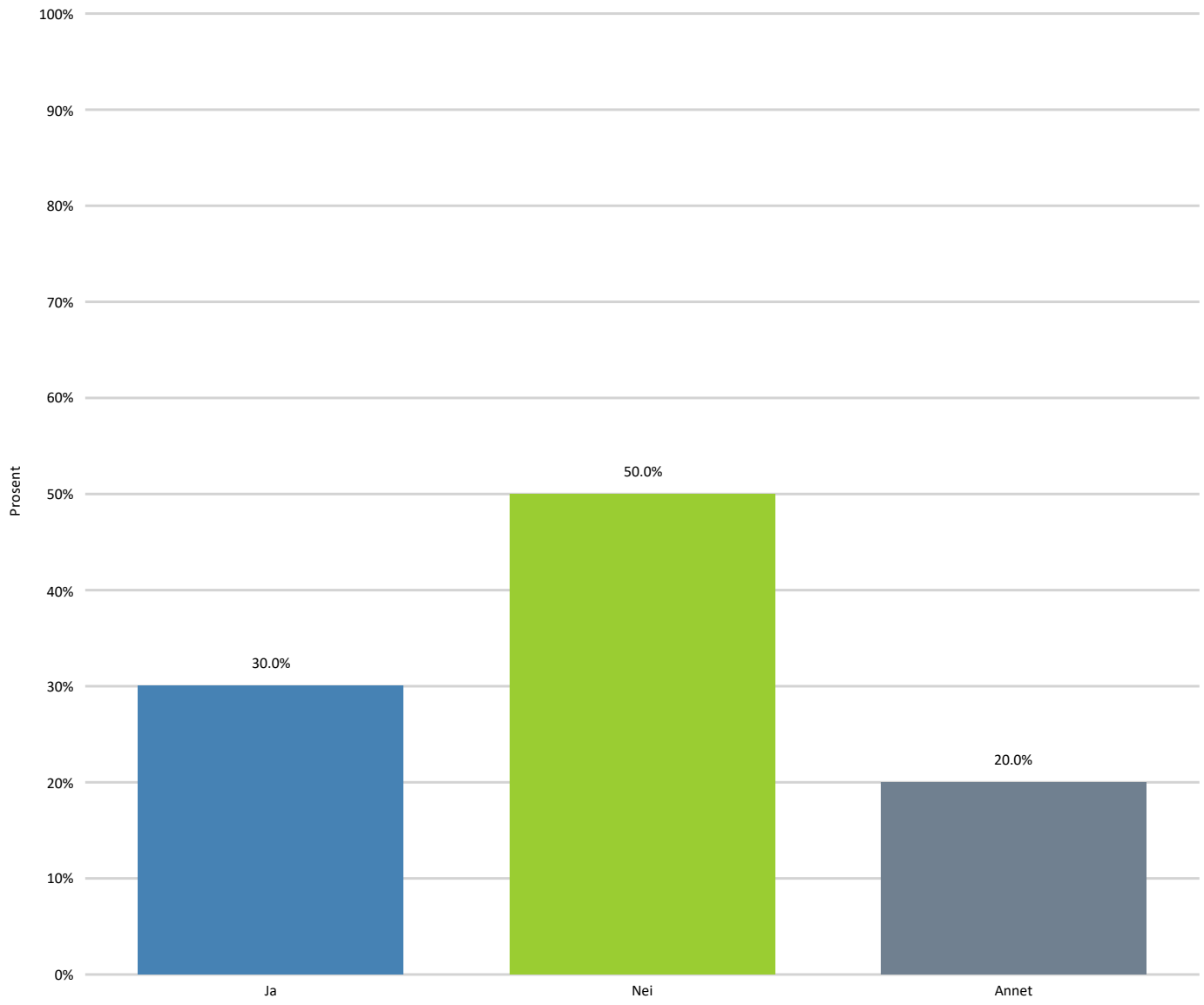
| Svar |
| --- |
| Oncomine Focus panel , starter med BRCA 1/2 |
| Ion TOrrent:<br>Myeloid<br>BRCA<br>Focus_35<br>Focus_23<br>OCCRA |
| Oncomine Focus Assay - Ion Torrent |
| Oncomine Childhood Cancer Research Assay<br>Oncomine HRR Pathway Predesigned Panel |
| Oncomine Focus, Oncomine Comprehensive, Oncomine Lung cfTNA Assay |
| OCA v.3 |
| Thermo Fischer:  Oncomine Precision Assay (Oncomine Focus Assay som back up) og Oncomine BRCA Research Assay |
| 1. Oncomine™ Focus Assay<br>2. Oncomine™ Childhood Cancer Research Assay<br>3. Oncomine™ BRCA Research Assay<br>4. Oncomine™ Myeloid Research Assay<br>5. TSO 500<br>6. Archer FusionPlex Sarcoma v2 Panel (Ion Torrent) |
| Ampliseq panel: Fokus, BRCA, Childhood, Myeloid<br>TSO500<br>Ion Torrent Genexus - Oncomine Precision Assay |
| Er ikke vi som sekvenserer |
| Illumina TruSight Tumor 15<br>AmpliSeq for Illumina BRCA panel<br>AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer assay |
| TSO500HT |
| OCAv3 ( snart Genexus DX express test for FFPE). |
| Dx express |

Del 4: Bibliotekspreparering/sekvensering

## 44. Hvilken sekvenseringsplate form?



## 45. Om sekvenseringsplate form er Ion Torrent er genusis tatt i bruk?




| Svar |
| --- |
| Ankommer sannsynligvis i løpet av 2024 |
| Straks- etter sommer 24. |

Tilleggsinformasjon: Funn av mye ikke relle deamineringer og sekvenseringsartefakter som tyder på fragmentering? Viser Referansegenenes coverage at sekvensering er vellykket og hvilken cut off/grense benyttes? Grense for antall NO CALL i antall gener? For Ion Torrent : Hvilken grense benyttes på Phred QC?

## 46. Hvilke kvalitetsparametre benyttes for vurdering av den enkelte prøve sekvensering?

| Svar |
| --- |
| DNA:<br>Mean read length<br>Mapped reads<br>Mean depth<br>Uniformity<br>MAPD<br><br>RNA:<br>Mean read length<br>Mapped reads<br>Mean depth<br>Intern kontroll (5/5)<br><br>Intern kontroll (5/5) for RNA |
| Phred QC > 20 |
| I utgangspunktet rapporteres kun funn med VAF> 5 % med coverage for posisjonen over 500 og Phred> 100.<br>Men vi åpner for å svare ut lavfrekvente funn. Disse har følgelig lav Phred score. Dette gjelder hovedsaklig hot spot varianter i onkogener som ofte lar seg verifisere med ortogonal metode. Disse rapporteres kun ut dersom de er forventede funn ut fra genpakken for tumorentiteten.<br>Dette gjøres også sporadisk for hematologiske prøver der tumorandel er lav, men prøvekvaliteten er god.<br>Ved usikkerhet rundt et viktig funn, kan vi velge å inkludere prøven i et nytt oppsett for å reprodusere resultatet før rapportering.<br>Vi er kjent med at flere amplikon i panelet har dårligere representasjon enn snittet, slik at varianter i disse områdene i blant kan rapporteres selv om coverage er under 500.<br>Prøver av dårlig kvalitet med mye deamineringsartefakter krever høyere kvalitetsparametere for rapportering, ofte opp mot VAF 15-20 % og coverage > 2000.<br>For øvrig vurderer vi uniformity score for alle prøver. Dersom mange amplikon i genpakken har feilet grunnet dårlig dekning, rapporteres prøven inkonklusiv. Unntaksvis kan en prøve med lav uniformity (< 80 %) godkjennes dersom de spesifikke genene i analysepakken er bra dekket, og bifunn vil være av lite konsekvens. |
| DNA (Torrent Suite)<br>Mapped Reads , % reads on target, Mean depth, Uniformity, Amplicon Read Coverage (Sjekker i tillegg coverage på aktuelle gener for krefttypen)<br><br>DNA kriterier(funn i Ion Reporter)<br>- QC-score Phred, Coverage, MAPD, Cut-off verdi for CNV inkludert tumor prosent, AF<br><br>RNA (Torrent Suite)<br>Mapped Reads<br><br>RNA (Funn) Ion Reporter<br>Total Mapped Fusion Panel Reads, Fusions minimal Total valid mapped reads, Ekspresjonskontroll counts, Ekspre. Ktr.detektert,<br>Fusjoner og skipping: Read counts pluss > 1% av Total Mapped Fusion Panel Reads |
| Uniformitet<br>Lesedybde<br>totalreads<br>Tumorandel<br>Amplikonlengde/fragmentering<br>In-line control (overamplifisering)<br>Ingen tumorandel etter analyse: ingen tumor på HE-snitt etter NGS<br>CNV-analyse mislykket: For høy MAPD (> 0,5)<br>Generell dårlig prøve: dersom flere QC-parametere ikke oppnås<br>Uegnet materiale for RNA-analyse: cytologisk utstryk<br>RNA analyse mislykket: Ekspresjonskontroll underkjent<br>No Call-posisjoner vurderes |
| Mean read length, uniformity, mapped reads, tumorprosent, MAPD |
| Ikke relavant for dette undersøkelse. |
| Amplicon dekning, antall reads som er over 500, |
| Er ikke vi som sekvenserer |

Illumina TruSight Tumor 15: Coverage, Error rate (hele sekvenseringen)

AmpliSeq for Illumina BRCA/CHC - DNA: amplicon coverage (%>500xcoverage), Total on-target aligned reads, Percent on-target aligned reads, Amplicon mean coverage, Uniformity of coverage (Pct > 0.2*mean)

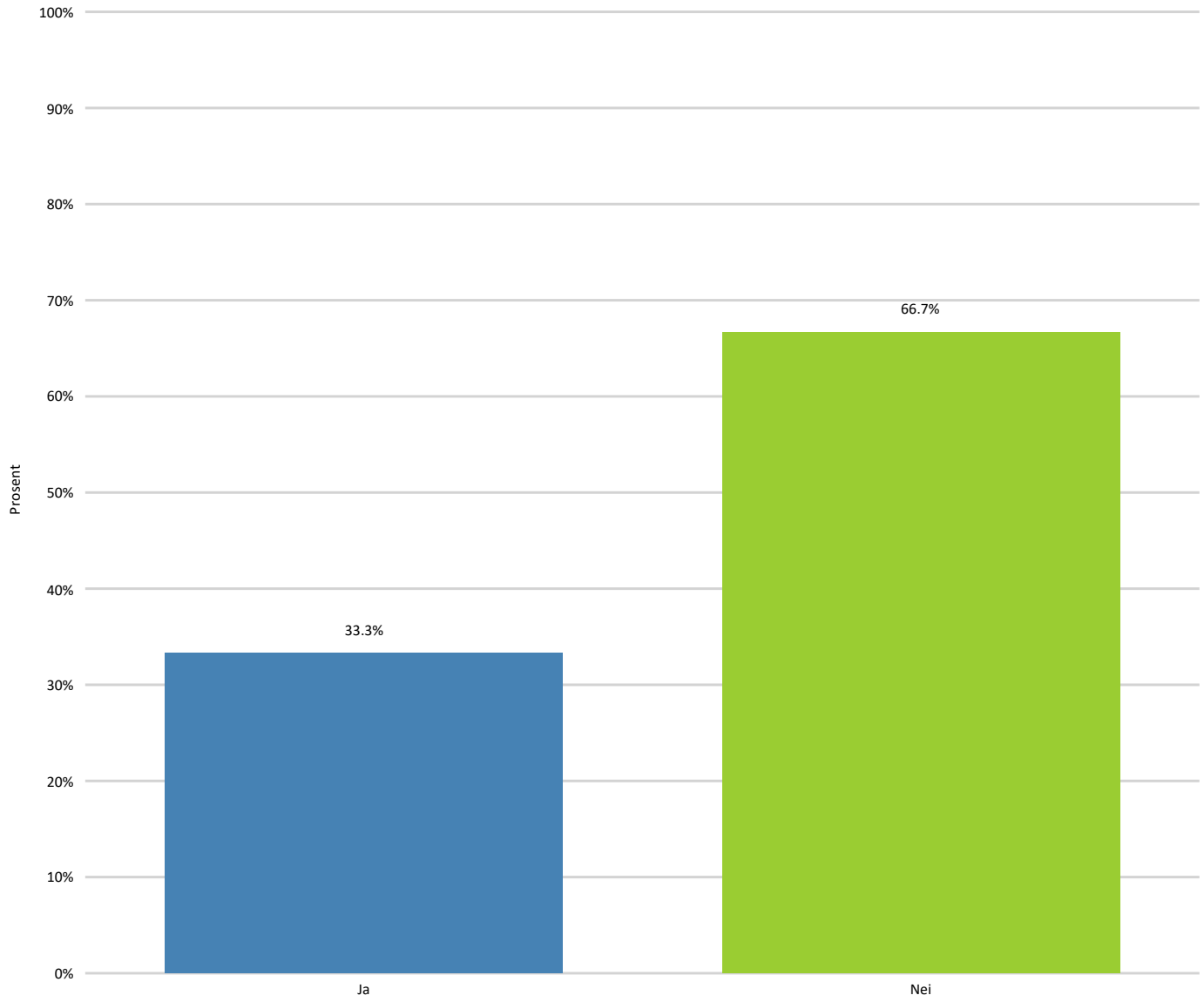
AmpliSeq for Illumina CHC - RNA:  Total on-target aligned reads, Percent on-target PF reads,Total PF reads, Total aligned reads,  Percent Q30 bases, Percent mismatches, Amplicon mean coverage

,

Vi vurderer om histogram, mean bp length, total callede varianter i TS, uniformity osv ift fragmentering + funn av mange trunkerende lavfrekvente eller dårlig kvalitetsparametre funn av deaminerte varianter i prøven- tyder på fragmentering.
Vurderer REF gener sin coverage (om de er lave), ekspresjonskontroller (>15 og minst 4 stk er OK), grad av fragmentering i RNA histogram, MAPD (<4), Phred QC (>40) ( men også i samsvar med coverage), strand bias,
Ved NO CALL i mange gener og/eller mange områder innenfor et gen vurderes det om genet kan tolkes (affiserer det hotspots områder- evt tilleggstester for avklaring)  eller om sekvenseringen er for dårlig (chip problem eller for lite input).

Genexus

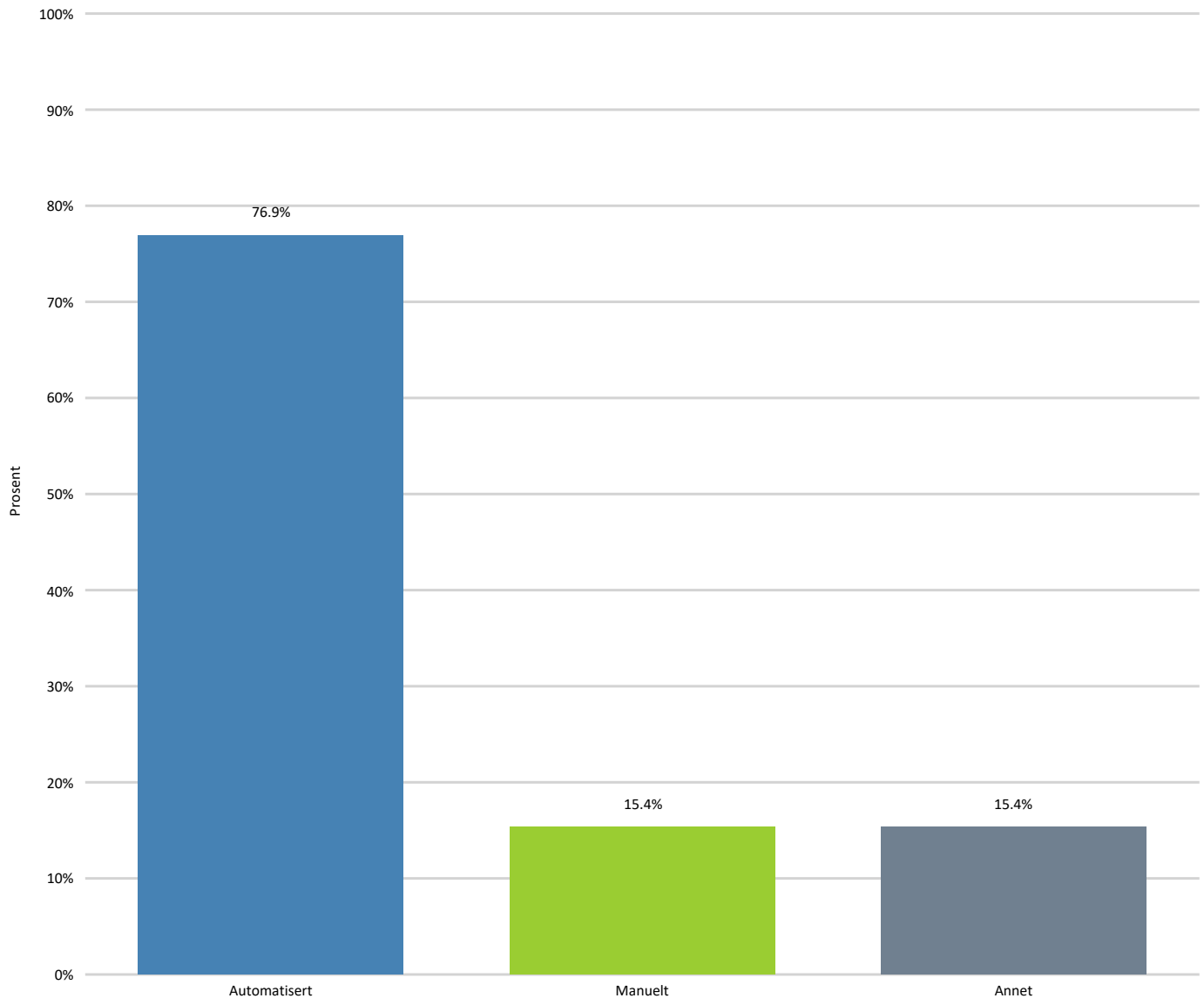
## 47. Har dere en minstegrense ift fragmentering av DNA/RNA?



## 48. Om det er en minstegrense ift fragmentering av DNA/RNA, spesifiser

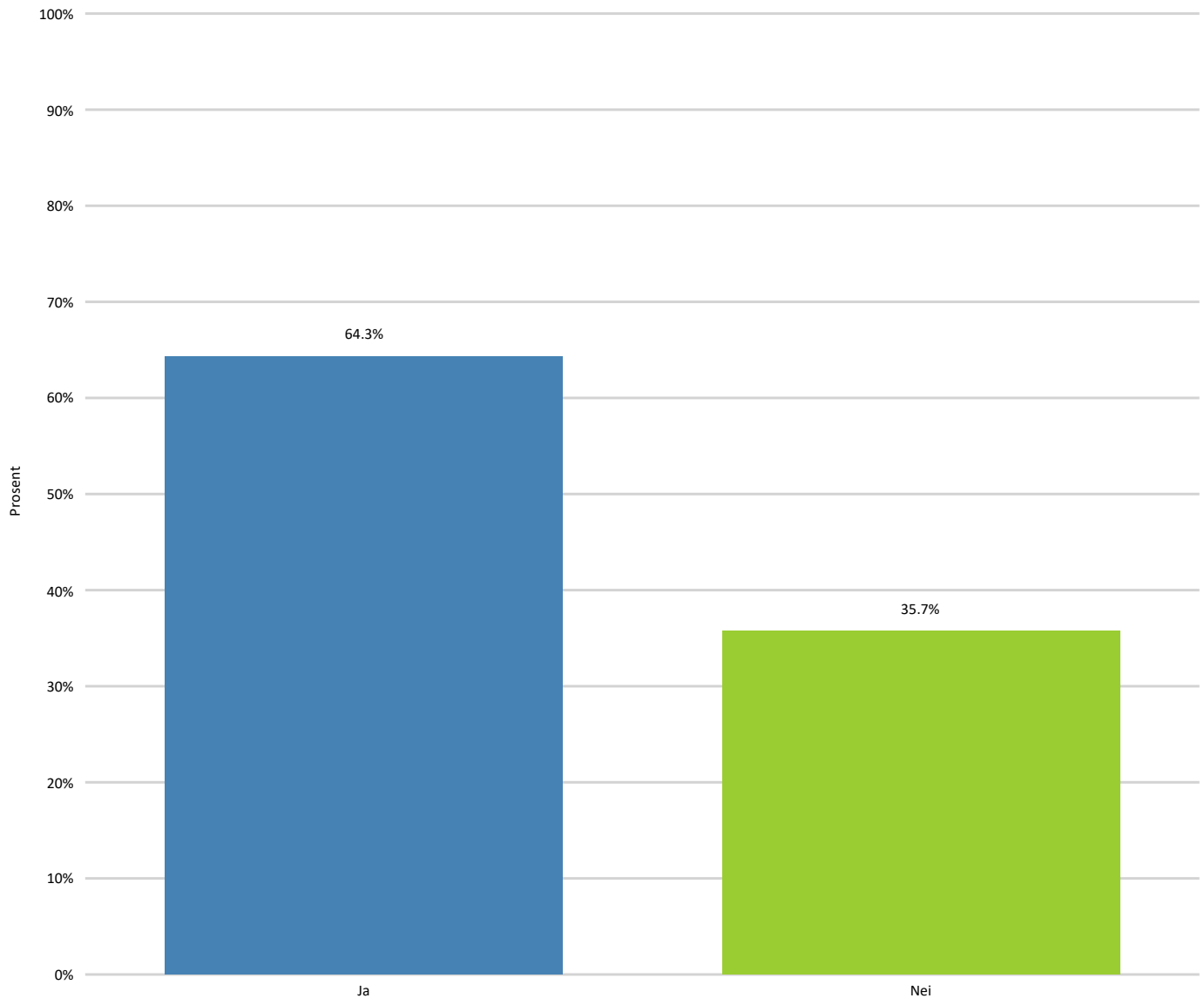
| Svar |
| --- |
| Gjennomsnittlig leselengde for DNA (100-115 bp) og RNA (>60 bp) |
| Total vurdering av antall tilgjengelig  genom molekyler og  andel av tumor vev |
| TSO500: Fragmentstørrelse over 185 bp, gjennomsnitt er 250bp |
| Kvalitet vurderes av pipline genexus, ingen resultat ved dårlig kvalitet. |

## 49. Hvordan gjøres bibliotek preperasjon?

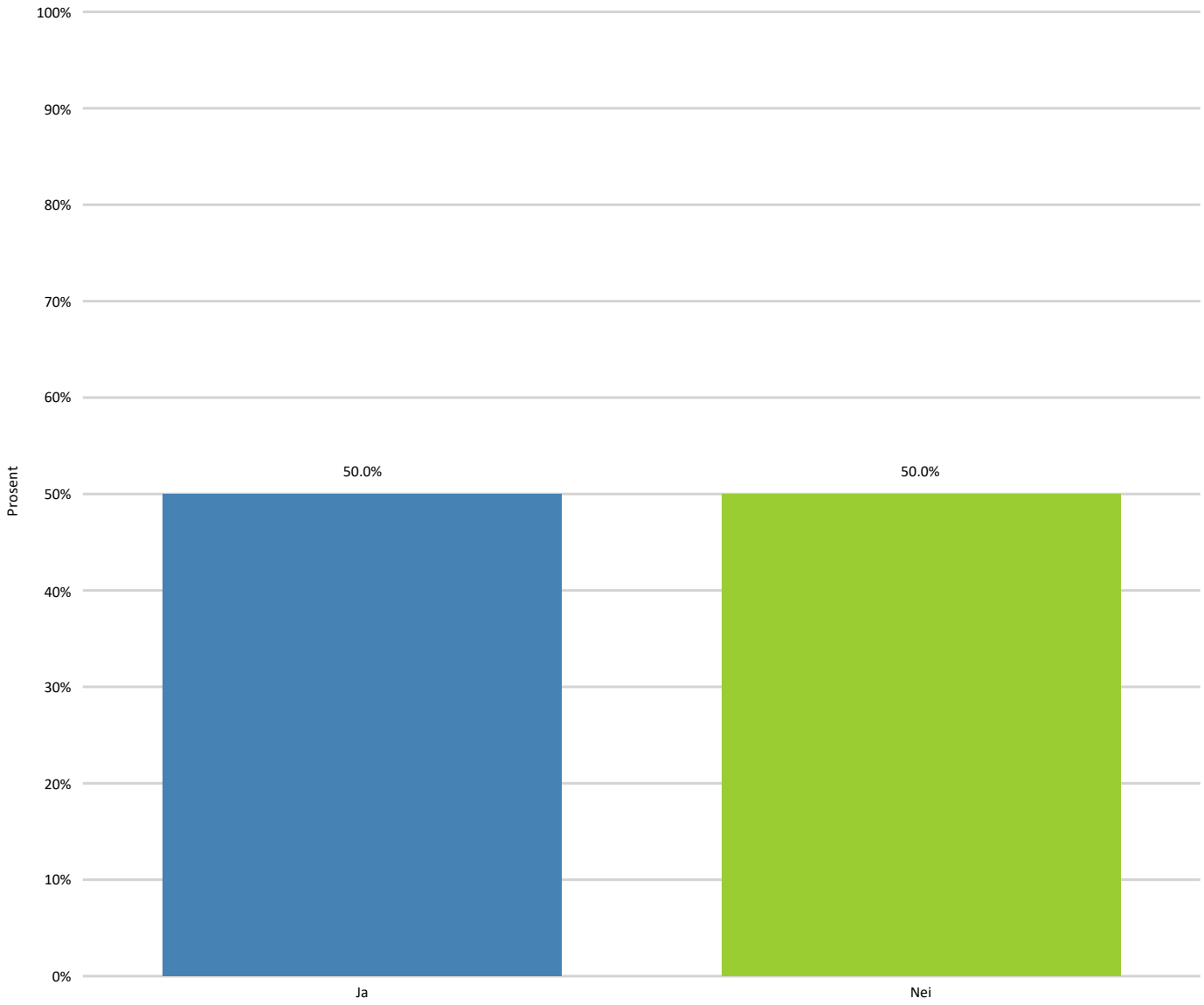



| Svar |
| --- |
| Semiautomatisert |
| både manuell og automatisert |

## 50. Måler dere biblioteket?



## 51. Har dere kvalitetsparametre for biblioteket?



## 52. Hvilke kvalitetsparametre har dere for biblioteket?

| Svar |
| --- |
| % usable sequence > 30<br>% ISP loading: > 50<br>Low Quality < 20 for DNA oppsett, høyere for RNA pga. degradert templat |
| DNA: Reads on target; > 90%, unifirmity of base coverage; >95%, amplicons med min 500 reads; > 90%, target base coverage at 500x; > 90% |
| Konsentrasjon av bibliotek på Qubit og fragmentstørrelse på Tapestaiton |
| Kvantitering med qubit av unormaliserte prøver og sjekk av renset bibliotek med elektroforese (Flash-gel system) |
| Ja, konsentrasjon, lengde og % adapter dimer. |
| Må være minimum kons på 50pM og paralleller må ikke avvike mer enn 1 ct verdi. |

## 53. Hvilken grense benyttes for grad av polyklonalitet i NGS oppsett?

| Svar |
| --- |
| < 45% |
| 30-45%. Litt høyre hvis lav "Low Quality". |
| Vi har ikke spesifikk grense for polyklonalitet, men høy polyklonalitet reduserer antall usable reads som igjen påvirker sensitivitet.<br>Vi har en grenseverdi for om totalt antall reads og usable reads, men individuelle prøver i biblioteket kan gjerne feile selv om chipen i seg selv har noe innenfor grensverdier.<br>Etter at vi på anbefaling fra Thermo har begynt å denaturere blandet DNA/RNA bibliotek på varmeblokk før templating, har ikke polyklonalitet vært et problem da denne ligger godt under 30 % med totalt antall reads opp mot 100 mill. |
| <45% eller mindre. Kommentar: hver prøve vurderes alltid og svar kan utgis selv om denne verdien overskrides |
| Final Reads % (trukket fra poliklonale reads/andre dårlige reads) ≥40% |
| Ingen krav for polyklonalitet. Vi ser på antall reads totalt, og for hver prøve. |
| Er ikke vi som sekvenserer |
| Benyttes ikke. |
| vet ikke. |
| 50% ( vurderer andre parametre også som total mapped reads, sekvenseringsdybde osv.) |
| Automatisert genexus |

## 54. Hvilken grense benyttes for sekvenseringsdybden til prøven og mapped reads på DNA og RNA?

| Svar |
| --- |
| Mapped reads<br>> 300.0000 |
| Sekvenseringsdybde: >1200<br>Mapped reads DNA: > 300 000<br>Mapped reads RNA: > 5000 |
| I utgangspunktet benyttes en grense på 4 mill reads pr. prøve for DNA. Anbefalingen fra Thermo er 3 mill, så noen prøver med enkel problemstilling der ønskede gener sekvenseres til adekvat dybde kan likevel rapporteres, men i hovedtrekk vil prøver under 4 mill være inkonklusive.<br>Thermo har satt grense for RNA >250 000, noe vi opplever som for lavt satt. Vi forsøkte oss først med en internt satt grense på 800 000, men opplevde siden store reagensproblemer fra Thermo. Til vanlig vil en prøve med under 800 000 reads være svært fragmentert og derfor være inkonklusiv uansett, men under den nevnte perioden fikk vi prøver uten fragmentering med lavt antall reads. I disse tilfellene benyttet vi en lavere cut-off så lenge prøvekvaliteten og primer pool representasjon var god.<br>Vi opererer ikke i dag med en fast satt grense utover Thermo sine anbefalinger, men ser at prøvene er inkonklusive av andre årsaker lenge før antall mapped reads blir for lav. |
| Sekvenseringsdybden: DNA Coverage: DNA >1000<br>RNA: Fusions minimal Total valid mapped reads per pool<br><br>Mapped Reads: DNA:4,500.000-6,500.000<br>RNA: 500.000 til 1,500.000 |
| Average Base Coverage Depth >1000<br>Mean Reads/Mapped Reads ≥4mill. (DNA) ≥0.5mill (RNA) |
| Ingen satte grenser. Dette blir også stilt opp mot tumorprosent og uniformity. Generelt vil DNA prøver med <500.000 mapped reads, og RNA med <20.000 mapped reads, bli tolket og svart ut etter en nøye gjennomgang og diskusjon blant molekylærbiologene. |
| over 500 reads |
| Er ikke vi som sekvenserer |
| TST15: 500 reads<br>CHC-DNA: 90-95% med lesedybde over 500 reads.<br>BRCA: > 99 % med lesedybde over 500 reads.<br>CHC-RNA: "total on-target aligned reads": minimum 250 000, men bør være over 1 mill. |
| vet ikke. |
| 1200 i sekvenseringsdybde , DNA: >4,5 - 12mill mapped reads ( vurderer alle prøve parametre om 4,5 mill er godt nok) RNA: >500 000 mapped reads |
| Automatisert genexus |

## 55. Hvordan dokumenteres og rapporteres avvikende DNA/RNA kvalitet hos dere? Følges dette opp med tiltak og vurderes årsaker? Ev. hvem gjør det?

**Svar**

Avvikende DNA/RNA:
Noteres for hver enkelt prøve, avvik rapporteres som kommentar i svarrapport

Tiltak &årsaker:
Om kvalitet skyldes dårlig fiksering eller feil forbehandling gis tilbakemelding til histologi.
Om avvike er grunnet lite prøvemateriale gis tilbakemelding til rekvirent i svarrapport om det muligens bør tas en ny biopsi

Hvem følger opp:
Alle som jobbe ved molekylærpatologi

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:

Avvikende DNA/RNA: På kvalitetskontroll av NGS resultat skjema
Tiltak &årsaker: Ber om ny prøve hvis vurderingen av kvalitetsparameterne tilsier det.
Hvem følger opp: Fagbioingeniør og fagansvarlig

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:
Vi rapporterer prøve som inkonklusiv, og så er det opp til medisinskfaglig patolog eller rekvirent å bestille på nytt preparat.
Vi har oppdaget systematisk feil som påvirker prøvekvalitet av RNA ved ekstraksjon på Qiacube. Dette ble oppdaget etter første runde sekvensering, og problemløsning er fortsatt pågående, men ekstraksjon utføres med annen metode.

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:

Avvikende DNA/RNA: Svares ut fra LIS-systemet med Inkonklusiv Tiltak &årsaker: Tiltak:Ber om nytt materiale hvis tilgjengelig Årsak: Gammelt materiale, nekrose, lite materiale, over-underfiksert materiale. Hvem følger opp: Genteknologisk personale og kvalitetskoordinator

Vi har en kvalitetskoordinator som følger en kvalitetsindikator knyttet opp mot analysen en gang per måned

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:

Avvikende DNA/RNA: mislykka/delvis godkjent/godkjent
Tiltak &årsaker: beskrives i svarrapport, følges via internkontroll
Hvem følger opp: Fagansvarlig og alle som rapporterer resultatene

Det legges inn forbehold i svaret om prøven svares ut til tross for dårlig kvalitet. Mislykket kjøring eller "ikke tilstrekkelig materiale" dokumenteres i Unliab som svar på bestilt analyse.
Tiltak: Undersøke fragmentering med Tapestation, ny isolering.

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:
gjenta analyse med en anden prøve

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:

Kan ikke se avvik på DNA/RNA før bibliotekseksprep utover utbytte, har ikke kvalitetskontroll før PCR mtp fragmentering.
Ny rens, eventuelt makrosissekert tumorområde eller annet representativt tumorvev (annen biopsi).

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Hvem følger opp:
Er ikke vi som sekvenserer

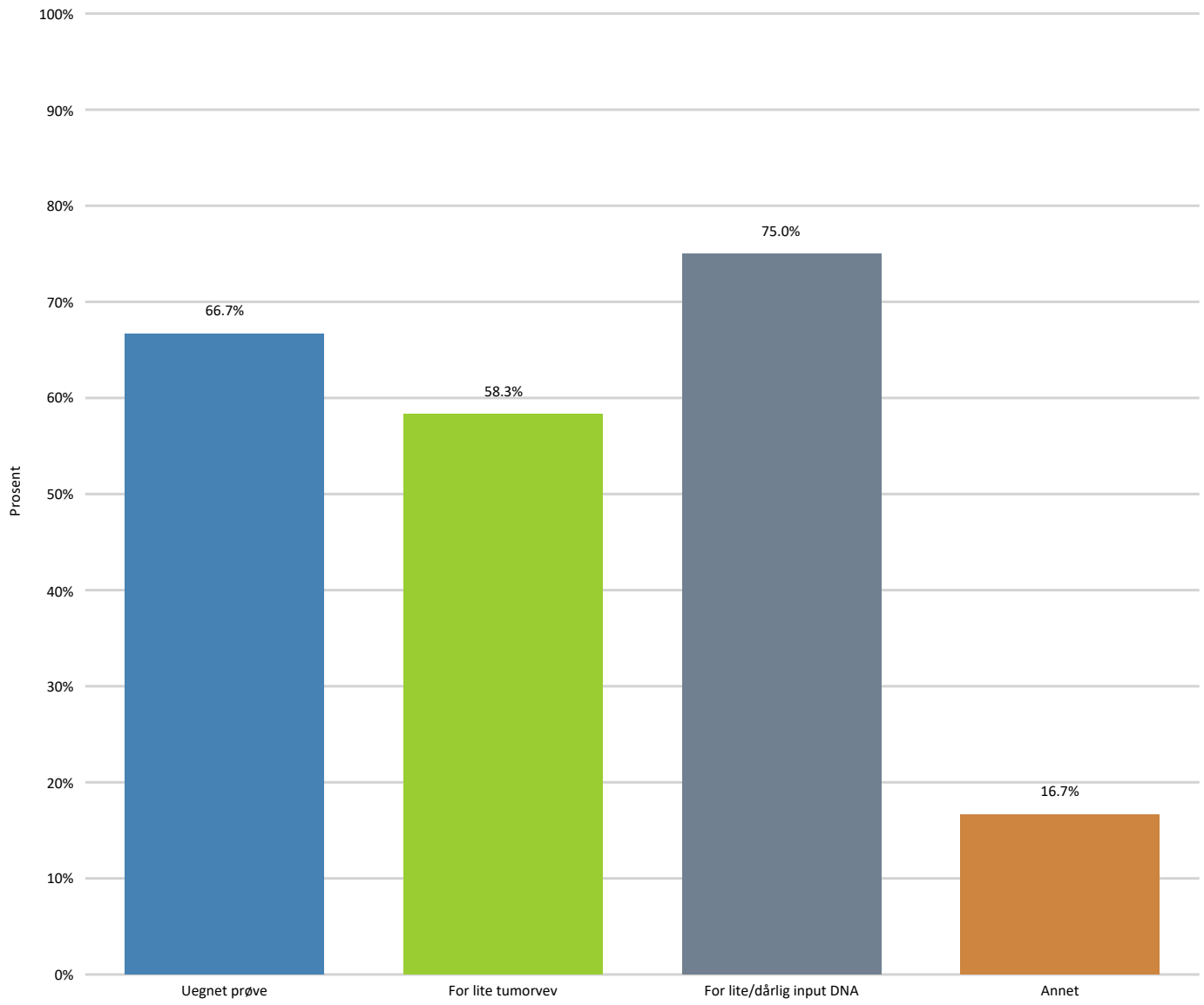
Avvikende DNA/RNA: dårlig kvalitet dokumenteres i svarrapport., og evt skrives det avvik i tilfeller der det er tydelig årsakssammenheng.
Tiltak &årsaker: det blir gjort feilsøk i det som er dokumentert om preparatet: ang. fikseringstid, transport, fikseringsmedium, lekkasjer osv evt blir det tatt kontakt med rekvirent pr telefon for å avdekke om de benytter formalin med/uten buffer.
Hvem følger opp: den som avdekker problemet gjør feilsøk og skriver avvik.

Avvikende DNA/RNA: Patolog informeres Tiltak &årsaker: Gir beskjed til rekvirent og evt prøver på nytt på annet materiale
Hvem følger opp: Patolog/ingeniør

Avvikende DNA/RNA: Rapporteres ut i resultattekst, evt inkonklusiv, dersom materiale er altfor dårlig.
Tiltak &årsaker: Ny blokk, dersom det er mer materiale og/eller tilleggsanalyser, Alt føres opp i NGS resultat excel ark og svares ut i LVMS tilslutt (lokal kommentar også)
Årsak: Feilsøker og følger opp, + Vi har møter med patologer og kliniker (fra lungeavd) med NGS resultater hver uke- viktig med samarbeid her, da mange feilkilder kan forklares/kartlegges også her.
Hvem følger opp: analyse ansvarlig og tolkere, evt med andre seksjoner dersom avvik skyldes feks dårlig parafin lot. Evt. bruk av hendelsesknapp i LVMS/ avvik i EQS systemet.

Avvikende DNA/RNA: Tiltak &årsaker: Kontrollere materialet, retest eller ny prøve Hvem følger opp:
molekylærbiolog

## 56. Hva var grunnen til at et vis antall NGS prøver ble ikke besvart i 2023(ikke IMPRESS studiet)?




| Svar |
| --- |
| veldig fragmentert DNA |
| Ikkje aktuelt, ngs fra 2024 |

## 57. Spesifiser antall prøver som ikke ble besvart i 2023

| Svar |
| --- |
| ca. 4%<br>21 prøver av til sammen 608 |
| < 10 |
| 10 |
| 4 prøver (av tot 203) |
| 20 pasientprøver |
| 1,3% av bestilt prøver som er uegnet i 2023 for forcus_35. |
| Ikke fullstendig oversikt, men 193 RNA/DNA prøver fra Ampliseq Fokus, Childhood og BRCA er skrevet ut som mislykket eller ikke tilstrekkelig materiale. |
| Det er ingen god oversikt over prøver som ikke er egnet til NGS analyse, og avvist før ekstraksjon. For prøver det er utført NGS på er følgende antall:<br>1 stk avvist i diagnostikk (BRCA)<br>3 stk SLP prøver (GenQA Lunge) avvist pga degradert materiale |
| Estimat: 20-30 prøver |
| Vanskelig å søke opp i LVMS, men ca. <5% av alle prøvene. Størstedelen av prøvene som har blitt besvart inkonklusiv er sterkt fragmenterte prostataprøver og få skjelett metastaser ( alder på prep, fikseringstid osv.). Enkelte prøver har for lite tumorandel til NGS. |
| Ikkje aktuelt, ngs fra 2024 |

## 58. Generelle kommentarer/innspill til kartlegginsundersøkelsen

| Svar |
| --- |
| En del spørsmål kan ikke svars bare ja el nei. Dette prosjektet handler om kvalitet av input DNA/RNA til NGS analyse, ikke om tolkning av NGS kvalitet. Det kan bli et andet prosjekt. |
| Er mange av spørsmålene som ikke er relevante for oss, da vi bare ekstraherer, ikke sekvenserer. Er i tillegg mange tilfeller der vi vet lite om fiksering og forbehandling av prøvematerialet, da vi ekstraherer fra mange eksterne prøver. |
| Litt uspesifikke spørsmål, vanskelig å forstå intensjonen bak spørsmålet dvs hva man ønsker å avdekke. Vanskelig når det var flere spørsmål i et spørsmål. Et spørsmål kan noen ganger tolkes på flere og ulike måter.<br>Undersøkelsen burde med fordel kunne lagres og ha muligheten til å gå tilbake til tidligere spørsmål. |
| Ikke alt som er relevant for oss.<br>Mye hos oss baseres på vurderinger som gjøres underveis, og er svært lite strømlinjeformet. Derfor ikke alle spørsmål som var så lette å svare på.<br>Noe uspesifikke spørsmål og litt repetitivt. |
| Viktig at preanalytiske forhold (fikserings start og fikseringstid osv.) angis av rekvirent og legges inn i felles labdata system.<br>Vi har møter med patologer og kliniker (fra lungeavd) med NGS resultater hver uke- viktig med samarbeid her, da mange feilkilder kan forklares/kartlegges også her (hvis feks. tumorandel er feilestimert, må justeres ift CNV og om >20%, brudd i fikseringstid osv.). |

NorPreM

Nasjonalt kompetansenettverk
for persontilpasset medisin